



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
FUNCIONALIZADAS CON MANOSA Y RADIOMARCADAS CON
TECNECIO 99 METAESTABLE**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

LEO REYES FLOR

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ANDRÉS DE LA CRUZ RODRÍGUEZ
GALVÁN**

COMITÉ TUTOR: DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA.

DR. ISRAEL VALENCIA QUIROZ

DR. VLADIMIR BASSIOUK EVDOKIMENKO

MÉXICO, EDO. MÉX. ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis abuelos **Manuel** y **Antonieta**, por acogerme en su casa, apoyarme en todo ámbito, velar por mi bienestar tanto tiempo y preocuparse por mí, gracias.

A mi abuela **Gabriela**, por la ayuda y confianza que depositó en mi para lograr llegar aquí.

A mi padre **Federico**, por apoyarme y preocuparse por mí día con día a lo largo de este camino.

A mi madre **Yeimi**, por cada esfuerzo realizado para que yo pudiera llegar a donde estoy.

A **cada persona de mi familia** que puso un grano de arena en mi educación para formar la persona que soy.

AGRADEMIENTOS

A la **UNAM Facultad de Estudios Superiores Iztacala** por ser mi segunda casa y el recinto donde me he formado profesionalmente.

Al **Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM** (Proyecto DGAPA-PAPIIT IA204521) por los apoyos recibidos para la realización del presente trabajo.

Al **Instituto Nacional de Cancerología (INCan)**, en especial al **Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular** de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer por facilitarme el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Margarita Rivera** y al **Laboratorio Central de Microscopía** del Instituto de Física por su valioso apoyo que complementó la investigación.

Al **Dr. Ignacio Terrazas** del laboratorio 8 de la UBIMED por su apoyo con el proyecto.

A mi asesor, el **Dr. José Andrés de la Cruz Rodríguez Galván** por haber depositado su confianza en mí, estar al pendiente de la correcta realización del proyecto y brindarme sus conocimientos.

A **cada uno de mis asesores del comité** por sus comentarios y consejos en cada parte de mi trabajo.

A mis **compañeros de laboratorio** por ayudarme en las adversidades y hacer más ameno el lugar de trabajo.

A mi segunda familia **Mireles, Sofí, Erika, Eshley, Marisa y Mariana**, su apoyo en las adversidades, todas las risas y cada momento vivido con ustedes, lo llevaré en mi corazón durante el resto de mi vida, gracias por todo.

A **Fátima Michelle** por cada buen momento vivido, sonrisa, abrazo, palabras y confianza, ante todo. Todo esto fue fundamental para poder culminar este proceso.

A **Vanessa Pérez** por ser una excelente amiga y confidente desde que nos conocimos. Su apoyo incondicional a lo largo de mi vida fue de gran ayuda para lograr este objetivo, gracias por siempre estar ahí.

A **Fátima Merino** por ser mi mejor amiga en esta vida y compartir tan bellos momentos conmigo, por acompañarme en cada logro obtenido, celebrar y brindarme su cariño y apoyo cada día. Te quiero, cucumber.

A **todas las personas** que pusieron un granito de arena en este viaje, porque gracias a ello, pude llegar a ser quien soy.

INDICE

| | | |
|--------|--|----|
| I | LISTA DE ABREVIATURAS | 1 |
| II | RESUMEN..... | 3 |
| III | INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 3.1 | Nanociencia y nanotecnología | 4 |
| 3.2 | Nanomateriales | 6 |
| 3.3 | Nanopartículas (NPs)..... | 8 |
| 3.4 | Etapas del cáncer | 9 |
| 3.5 | ^{99m} Tc-AuNPs-MAN como sonda para la localización de macrófagos M2 en ambientes tumorales..... | 13 |
| IV | HIPÓTESIS | 15 |
| V | OBJETIVO GENERAL..... | 15 |
| VI | OBJETIVOS PARTICULARES..... | 15 |
| VII | MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 7.1 | Síntesis del compuesto AuNPs-ALA | 16 |
| 7.2 | Síntesis del compuesto AuNPs-MAN..... | 16 |
| 7.3 | Espectrofotometría UV-Vis..... | 17 |
| 7.4 | Diámetro Hidrodinámico..... | 17 |
| 7.5 | Potencial zeta..... | 18 |
| 7.6 | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)..... | 18 |
| 7.7 | Microscopía de efecto túnel (STM)..... | 20 |
| 7.8 | Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 21 |
| 7.9 | Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) | 21 |
| 7.10 | Análisis elemental | 22 |
| 7.11 | Síntesis del compuesto HYNIC-AuNPs-MAN y HYNIC-AuNPs-ALA | 22 |
| 7.12 | Radiomarcado de los compuestos HYNIC-AuNPs-MAN y HYNIC-AuNPs-ALA con ^{99m} Tc..... | 22 |
| 7.12.1 | Eficiencia de radiomarcado | 23 |
| 7.12.2 | Pureza del radiomarcado | 23 |
| 7.12.3 | Estabilidad del radiomarcado | 24 |
| VIII | RESULTADOS | 25 |
| 8.1 | Caracterización | 25 |
| 8.1.1 | Espectrofotometría UV-Vis | 25 |

| | | |
|-------|---|----|
| 8.1.2 | Diámetro hidrodinámico y Potencial Z | 26 |
| 8.1.3 | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) | 27 |
| 8.1.4 | Microscopía de efecto túnel (STM) | 32 |
| 8.1.5 | Microscopía electrónica de Barrido (SEM) | 34 |
| 8.1.6 | Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) | 36 |
| 8.1.7 | Análisis elemental..... | 38 |
| 8.2 | Radiomarcado..... | 39 |
| IX | DISCUSIÓN..... | 43 |
| X | CONCLUSIONES | 46 |
| XI | PERSPECTIVAS DE TRABAJO..... | 46 |
| XII | ANEXOS | 46 |
| XIII | REFERENCIAS..... | 49 |

I LISTA DE ABREVIATURAS

^{99m}Tc: Tecnecio 99 metaestable.

ALA: α ácido lipóico.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

EDC: Clorohidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida.

EDDA: ácido etilendiamino-N, N'- diacético.

FDA: Administración de Alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (Por sus siglas en inglés Food and Drug Administration).

FNII: Fibronectina II.

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Por sus siglas en inglés Fourier-Transform Infrared Spectroscopy).

hrs.: Horas.

HYNICGGC: Hidrazinonicotinamida-Glicina-Glicina-Cisteína.

INCan: Instituto Nacional de Cancerología.

keV: Kiloelectronvoltio.

LBL: Layer-by-layer.

m: Metro.

M: Molar.

MAN: Manosa.

Manosa-NH₂: Clorohidrato 2-Aminoetil 2,3,4,5-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido.

mCi: Milicurio.

mg: Miligramo.

min.: Minutos.

mL: Mililitros.

mM: Milimolar.

mV: Milivoltio.

nm: Nanómetro.

NPs: Nanopartículas.

PBS: Amortiguador Salino de Fosfatos.

RCF: Fuerza centrífuga relativa.

RM, CD206 o MRC1: Receptor de manosa.

rpm: Revoluciones por minuto.

SEM: Microscopía electrónica de barrido (Por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope).

SLN: Ganglios linfático Centinela (Por sus siglas en inglés Sentinel Lymph Node).

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón único (Por sus siglas en inglés Single-Photon Emission Computed Tomography).

SSI: Solución salina isotónica.

STM: Microscopía de efecto túnel (Por sus siglas en inglés Scanning Tunneling Microscopy).

TAMs: Macrófagos asociados a tumores (Por sus siglas en inglés Tumor-Associated Macrophages).

HRTEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (Por sus siglas en inglés High-resolution transmission electron microscopes).

µL: Microlitros.

µm: Micrómetros.

II RESUMEN

En el presente trabajo se utilizaron las bases de la nanociencia y la nanotecnología con ayuda de otras áreas como la biología, la medicina, la física, para desarrollar un medio de contraste para tomografía computarizada por emisión de fotón único con un acoplamiento de tomografía computarizada (SPECT-CT). El medio de contraste consistió en una nanopartícula de oro (AuNPs) de 20 nm funcionalizada con ácido lipóico unido covalentemente a moléculas de manosa aminada que después se radiomarcaron con Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc). El objetivo de la síntesis del nanosistema es poder utilizarlo para la localización específica de macrófagos M2 en ambientes tumorales y obtener imágenes moleculares de SPECT-CT, ya que su localización podría ayudar en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Se realizó la caracterización de las muestras por distintas técnicas como espectrofotometría UV-Vis para determinar la estabilidad de las nanopartículas después de las distintas etapas de funcionalización. Se analizó el diámetro hidrodinámico y potencial Z para evaluar la estabilidad coloidal del sistema; espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para confirmar la presencia de los grupos funcionales de las distintas etapas de funcionalización; microscopía de efecto túnel (STM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) para observar la morfología y la estructura de las nanopartículas y un análisis elemental para confirmar la composición química de las muestras; además, el radiomarcado de las AuNPs funcionalizadas con ácido lipóico y manosa se verificó por medio de evaluaciones de eficiencia, pureza y estabilidad radioquímica. Con los análisis mencionados se confirmó la funcionalización de las nanopartículas con ácido lipóico y su unión covalente a la molécula de manosa aminada, a su vez se describieron las características de los compuestos y se confirmó la eficiencia, pureza y estabilidad radioquímica del medio de contraste. El paso siguiente en el presente trabajo involucraría corroborar la localización específica de los macrófagos M2 por medio de sus receptores de manosa, así como los análisis preclínicos como la evaluación de su farmacocinética, toxicidad, entre otros, además de probarlo en sistemas *in vivo* y así poder obtener imágenes moleculares de ellos en áreas tumorales por medio de SPECT-CT.

III INTRODUCCIÓN

3.1 Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia y la nanotecnología son áreas de investigación altamente activas que estudian las propiedades de los nanomateriales a nivel atómico y molecular; son áreas multidisciplinarias donde convergen ramas de conocimiento como física, ciencia de los materiales, química, biología, medicina, medio ambiente, farmacéutica, entre otras; permitiendo a científicos el estudio de propiedades de materiales y el desarrollo de aplicaciones (1,2).

El término “nano” proviene del griego “enano” y se ha aplicado en términos y conceptos que denotan fenómenos y objetos de dimensiones de una mil millonésima parte de metro (1×10^{-9} m) (2). En la **Figura 1** se puede apreciar una comparación de tamaños que permiten percibir mejor el tamaño descrito.

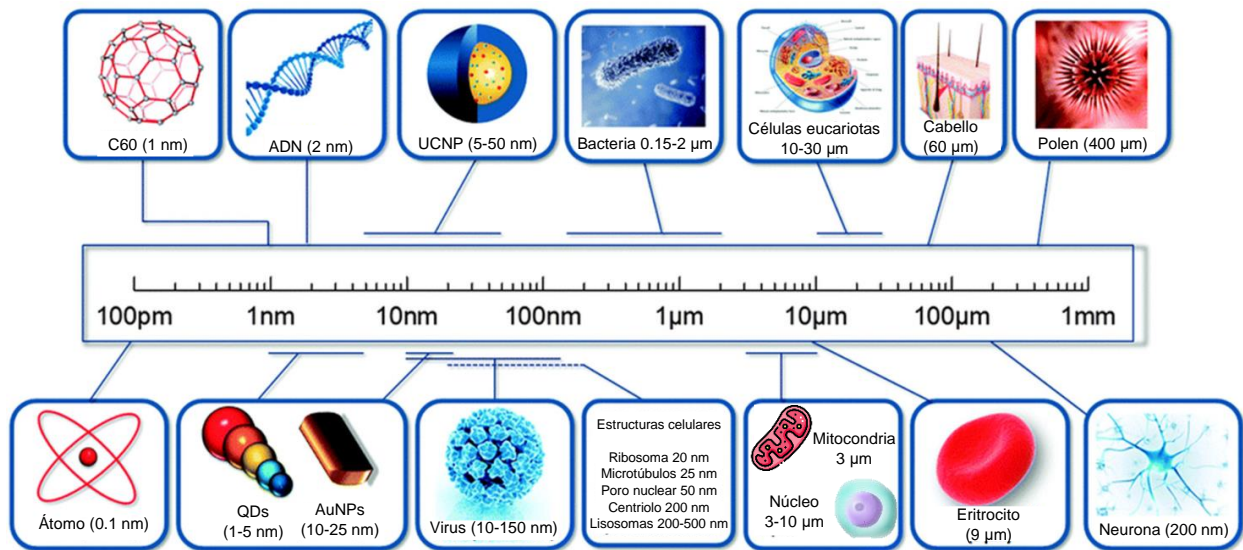


Figura 1. Una comparación de tamaños entre nanomateriales, otros compuestos, células y organismos biológicamente relevantes. Imagen modificada de (3).

Por otro lado, el término “nanotecnología” fue acuñado por primera vez por Norio Taniguchi en 1974, describiéndola como el área que consiste principalmente en procesos de separación, consolidación y deformación de los materiales por un átomo o molécula (4). Sin embargo, la definición se ha adaptado y a pesar de no haber una definición única, la nanotecnología se describe como aquella que estudia, diseña, caracteriza, fabrica y

aplica estructuras, dispositivos y sistemas controlando la forma y propiedades de la materia a nanoescala, refiriéndose al tamaño comprendido entre 1 y 100 nm de dimensión (5), mientras que la nanociencia “tiene por principio, controlar y manipular la materia en la nanoescala, es decir a nivel de átomos y moléculas”(6).

Se establece una escala relativa con un mínimo de 1 nm y un máximo de 100 nm. Esto se debe a que suele ser el umbral en donde los materiales presentan o adquieren propiedades diferentes a las que tendrían a una escala mayor; cabe destacar que el límite de 100 nm no es totalmente estricto (1).

Hay varios aspectos importantes a comprender antes de adentrarse de lleno en el mundo de la nanociencia y nanotecnología, entre estos es que la nanotecnología es multidisciplinaria e interdisciplinaria. Se entiende por multidisciplinaria la relación preliminar entre dos o más disciplinas y por interdisciplinaria a que los lazos entre varias disciplinas son más fuertes, se sobreponen o integran, permitiendo investigaciones y trabajos en colaboración de diversos profesionales (1,7). Otro aspecto importante a considerar, es que las leyes del “nanouniverso” las estudian la nanoquímica y la nanofísica, pues sus propiedades están regidas entre la física clásica y la mecánica cuántica, entre estas leyes encontramos las siguientes (7,8):

- El intercambio de energía entre átomos y partículas sólo puede ocurrir en paquetes discretos llamados *cuantos de energía*.
- Las ondas de luz, bajo determinadas condiciones, se pueden comportar como partículas (fotones).
- En algunas circunstancias, las partículas se pueden comportar como ondas.
- Es imposible conocer al mismo tiempo la velocidad y posición exacta de una partícula, debido al principio de incertidumbre de Heisenberg.

Dentro del siglo XXI, se menciona que la nanotecnología se puede comparar en impacto de vida humana a un evento tan importante como el desarrollo de los antibióticos en el siglo XX, los circuitos integrados, la microelectrónica y los polímeros hechos por el hombre (7). Su relevancia ha sido tanta, que empresas que adquirieron fama en los últimos años a raíz de la pandemia por SARS-CoV-2 como Pfizer la utilizan actualmente,

un ejemplo del uso que le han dado es la creación de nanocápsulas de liberación de insecticidas, fungicidas, plaguicidas, herbicidas y fertilizantes para apoyar al sector agrícola (9).

3.2 Nanomateriales

Los nanomateriales presentan un comportamiento diferente en la nanoescala al del material en una escala superior a los 100 nm debido a propiedades físicas y químicas novedosas que presentan en la escala nanométrica, pues dichas propiedades en cualquier material están determinadas por las interacciones entre electrones e iones-electrones, al reducir el espacio donde pueden moverse los electrones, es posible encontrar nuevos efectos debido al confinamiento espacial (10), un ejemplo de ello son los plasmones superficiales en las AuNPs, este efecto se da debido a la relación del tamaño nanométrico de las NPs y de la longitud de onda de un haz de luz al que son expuestas, ocasionando oscilaciones colectivas de los electrones libres existentes en los átomos de las NPs, además esto está asociado a energías discretas, por lo que las transiciones electrónicas debido a las oscilaciones originan una extinción de una parte de la luz incidente y producen un efecto de coloración en el sistema, pues la absorción predomina sobre la difusión y esta última determina el color de la suspensión (1,11). Debido a las interacciones mencionadas, cuando se desarrollan nuevos nanomateriales, es importante estudiar todas las propiedades que pueda tener para poder estipular los efectos positivos encontrados y advierten los posibles peligros derivados del tamaño nanométrico (10,12).

De manera general y siguiendo la **Figura 2**, los nanomateriales se pueden clasificar en 4 tipos de acuerdo a las dimensiones en la escala nanométrica que estos poseen (1):

- Materiales de dimensión 0: Nanopartículas.
- Materiales de 1 dimensión: Nanoalambres y nanotubos.
- Materiales de 2 dimensiones: Películas delgadas.
- Materiales de 3 dimensiones: Sólidos formados por unidades nanométricas.

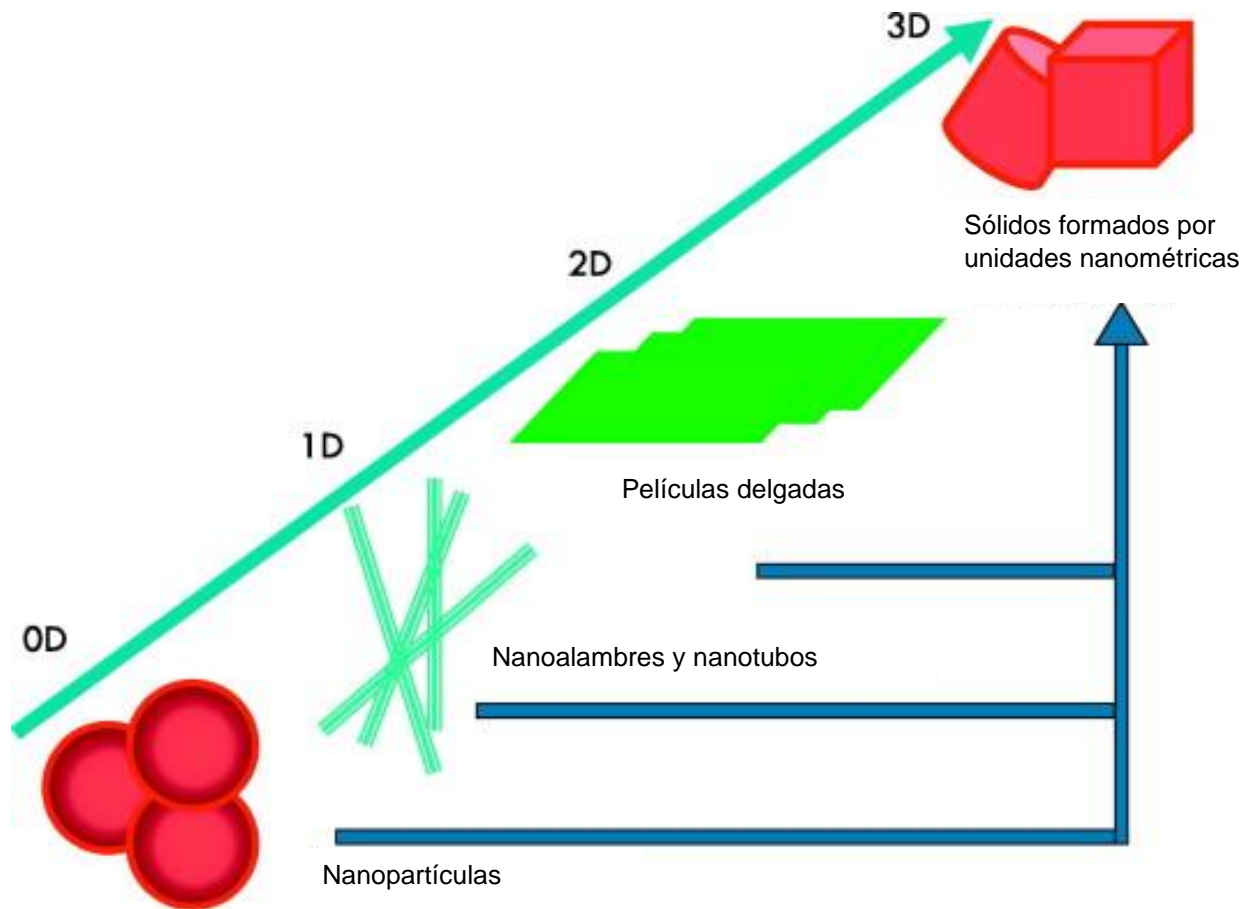


Figura 2. Clasificación de nanomateriales por su dimensionalidad. Imagen modificada de (13).

Cada uno de estos nanomateriales se puede emplear en una gran variedad de ramas de investigación. Un ejemplo de esto son los puntos cuánticos, los cuales están fabricados por nanocristales semiconductores y contienen sólo unos cientos de átomos, son nanomateriales de baja dimensionalidad y tamaño nanométrico que tienen un efecto de confinamiento en su estructura y al ser excitados emiten luz en diferentes longitudes de onda dependiendo el tamaño, por lo que son útiles en marcadores biológicos de actividad celular (6). Otros beneficios y/o usos que tienen estos nanomateriales recaen desde el ámbito industrial gracias a propiedades como morfológicas, térmicas, mecánicas, termomecánicas, espectroscópicas, ángulo de contacto y cristalográficas. Por ejemplo, los nanotubos de carbono en mezclas de ácido poliláctico se propone como material de embalaje (14). Otros ejemplos de aplicaciones para los nanomateriales recaen en el campo agrícola, donde se plantean como biointegradores de fertilizantes (7,15) y en el biomédico como tratamiento de la fibrosis quística (16).

3.3 Nanopartículas (NPs)

Aunque las NPs parecieran un material totalmente revolucionario, algunas como las de plata (AgNPs) y las de oro (AuNPs) se usaron como pigmentos para vitrales desde el siglo X d.C. (7). A su vez, estas últimas también se fueron empleadas por los egipcios con fines medicinales y por los chinos como colorantes orgánicos de porcelanas (1).

Actualmente representan un campo en constante expansión para las áreas de la fotónica, electrónica, sensores, medicina, control de contaminación y tecnología ambiental, dentro de las cuales podemos destacar aplicaciones biomédicas en bioimagen y de administración de fármacos y diagnóstico (17), pues se plantean como componentes esenciales de nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos en la nanomedicina (1).

Las NPs al igual que el resto de los nanosistemas, se encuentran entre 1-100 nm; además, dependiendo de su tamaño y el material metálico del que estén hechas pueden diferir en el color de la suspensión, por ejemplo las AuNPs pueden ser de color rojo intenso, azul pálido o púrpura (1,11). Las propiedades ópticas y electrónicas de las AuNPs como los plasmones de superficie para aquellas menores a 30 nm de diámetro mencionado anteriormente, dependen en gran medida del tamaño, superficie y sus características físicas, químicas y morfológicas (11,17). Extendiendo la idea anterior, en las NPs se aprecia un incremento notable del área de superficie con relación al volumen respecto a sólidos volumétricos y a su vez, los niveles electrónicos de éstas son discretos, lo que da lugar a la manifestación de efectos cuánticos; he aquí el origen del fenómeno los plasmones superficiales (1).

Gracias a la gran variedad de propiedades adquiribles, las áreas que abarca la investigación de NPs de tipo coloidales como las nanoesferas, nanocápsulas dendrímeros, entre otras, se han vuelto especialmente cotizadas, pues podrían dar solución a trastornos graves e incluso se han planteado para tratar patologías como el cáncer usándolas para la liberación de fármacos (17). Sin embargo, también se han empleado AuNPs unidas a anticuerpos monoclonales específicos para una variedad de cáncer, se dirigen a la localización exacta de las células cancerígenas y utilizando un láser de tratamiento con longitud de onda igual a la de las AuNPs, estas tienden a vibrar

liberando la energía en forma de calor, destruyendo así el tumor prácticamente sin daño en el tejido circundante (1).

Lo anterior es una de las razones por las cuales las AuNPs se consideran nanomateriales valiosos para el diagnóstico de enfermedades, pues funcionalizadas son agentes de contraste ideales para técnicas de imagen híbridas como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT)(18).

Para el diseño de nanosondas marcadas a partir de AuNPs, es necesario la funcionalización de estas. La palabra funcionalizar hace referencia a unir un agregado molecular a las AuNPs que amplía o agrega características nuevas, un ejemplo de ello puede ser la unión de portadores de antígenos apropiados a las AuNPs, los cuales les ayudarán a superar barreras biológicas (19), en los cuales se mide la “avidez” o fuerza de enlace (20).

Hay diversos motivos por los cuales la funcionalización de las NPs es favorable, por ejemplo, gracias a la incorporación de pequeñas moléculas bioactivas en sistemas de suministro de escala nanométrica, pueden aumentar la biodisponibilidad de un fármaco y la eficiencia terapéutica, para proporcionar una terapia deseable mediante la focalización (17) e inclusive algunos otros trabajos, prometen una disminución o nula toxicidad, mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad, esto ocupando la forma de funcionalización que mejor se acople a los objetivos del proyecto (21). Hablando de un caso en particular de buena funcionalización, los grupos basados en azufre son fácilmente adsorbidos en superficies de oro, lo cual permite la funcionalización de AuNPs con moléculas pequeñas y biomoléculas (22).

3.4 Etapas del cáncer

De acuerdo con la American Cancer Society, para clasificar al cáncer existe un sistema denominado TNM, el cual asigna una letra o número que describe el tumor, los ganglios y la metástasis. A continuación se describe lo que significa cada letra y número de dicho sistema (23):

- **T – Tumor.** Se refiere al tamaño del tumor primario (original).

- **TX** indica que no hay información sobre el tumor primario o que no fue posible su análisis.
- **T0** indica que no se tiene evidencia del tumor primario (que no se pudo localizar).
- **Tis** significa que las células cancerosas se reproducen en la capa más superficial del tejido en donde se originó el tumor, sin invadir los tejidos más profundos. Puede que un tumor con esta clasificación sea referido también como cáncer *in situ* o *precáncer*.
- Cualquier número enseguida de la letra T (como **T1, T2, T3, T4**) podrían describir el tamaño del tumor y/o qué tanto se ha propagado hacia estructuras cercanas en el cuerpo. Entre mayor sea el número T, mayor el tamaño del tumor y/o mayor la propagación de tejidos cercanos.
- **N - Nódulos.** se emplea para indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios o nódulos linfáticos regionales.
 - **NX** Indica que no hay información sobre los ganglios linfáticos cercanos o que no fue posible su análisis.
 - **N0** indica que los ganglios linfáticos cercanos no contienen células cancerosas.
 - Los números después de la N (como **N1, N2, N3**) podrían describir el tamaño de la invasión, la ubicación y/o el número de ganglios linfáticos cercanos afectados por el cáncer. Cuanto mayor sea el número N, mayor es la propagación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos.
- **M – Metástasis.** Determina si el cáncer se ha propagado (hecho metástasis) hacia otras partes del cuerpo.
 - **M0** indica que no hay propagación distante del cáncer.
 - **M1** indica que sí hay propagación hacia tejidos u órganos que son distantes al lugar donde surgió el cáncer.
- Cualquiera de las categorías T, N y M puede ser precedida por una “**c**” o una “**p**” minúscula para indicar si la clasificación de la etapa es clínica o patológica.

- Para los casos de re-estadificación del cáncer tras terapia neoadyuvante u otro tratamiento, la letra “y” minúscula precede a las letras anteriores para una categoría más detallada.
- Para los casos de re-estadificación del cáncer tras una recurrencia o progresión, la letra “r” minúscula también podría proceder en una denominación de categoría más detallada.

Una vez determinados los valores para T, N y M, se asigna un valor en conjunto, esta asignación se da por valores del 1 al 4 indicados con números romanos, siendo los cánceres de etapa I los menos avanzados y suelen tener una prognosis favorable, mientras que, a etapas más avanzadas, el desarrollo de la enfermedad y su propagación aumenta (23). Las etapas se describen a continuación (24):

- **Etapa 0:** Indica carcinoma *in situ*. Tis, N0, M0.
- **Etapa I:** Cáncer localizado. T1-T2, N0, M0.
- **Etapa II:** Cáncer localmente avanzado, etapas tempranas. T2-T4, N0, M0.
- **Etapa III:** Cáncer localmente avanzado, estudios tardíos. T1-T4, N1-N3, M0.
- **Etapa IV:** Cáncer metastásico. T1-T4, N1-N3, M1.

Con la finalidad de una mejor comprensión del sistema TNM, en la **Tabla 1** específica en cáncer de células renales, se establece un ejemplo de su uso, sin embargo, el sistema es aplicable para cualquier tipo y localización de cáncer. También se pueden observar algunos cambios que se le han efectuado al sistema hasta el modelo actual previamente descrito.

Tabla 1. Comparación entre diferentes versiones del sistema TNM. Tabla modificada de (25).

| Estadio | Clasificación | Hermanek et al, 1987 | Sobin et al, 1997 | Greene et al, 2002 |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Tamaño/Extensión del tumor | | | | |
| Enfermedad localizada | T1 | Tumor ≤2.5 cm, limitado al riñón | Tumor ≤7.0 cm, limitado al riñón | NA |

| | | | | |
|---------------------------------------|-----|--|--|--|
| | T1a | NA | NA | Tumor ≤ 4 cm, limitado a riñón |
| | T1b | NA | NA | Tumor <4 ≤7 cm, limitado a riñón |
| | T2 | Tumor > 2.5 cm limitado a riñón | Tumor >7 cm, limitado a riñón | Tumor >7 cm, limitado a riñón |
| Enfermedad localmente avanzada | T3 | Se extiende a venas, invade la adrenal o grasa peri-renal pero no pasa la Gerota | Se extiende a venas, invade la adrenal o grasa peri-renal pero no pasa la Gerota | Se extiende a venas, invade la adrenal o grasa peri-renal pero no pasa la Gerota |
| | T3a | Extensión peri-renal o glándula suprarrenal | Extensión peri-renal o glándula suprarrenal | Extensión peri-renal o del seno renal. Extensión adrenal suprarrenal |
| | T3b | Extensión vena renal | Vena renal o cava infra-diafragmática | Vena renal o cava infra-diafragmática |
| | T3c | Vena cava infra-diafragmática | Vena cava supra-diafragmática | Vena cava supra-diafragmática |
| | T4 | Extensión a cápsula de Gerota | Extensión a cápsula de Gerota | Extensión a cápsula de Gerota |
| | T4a | Vena cava supra-diafragmática | NA | NA |
| | T4b | NA | NA | NA |
| Ganglios regionales | N1 | Metástasis en un ganglio ≤2cm | Metástasis en un ganglio regional | Metástasis en un ganglio regional |

| | | | | |
|-------------------|----|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | N2 | Metástasis en un ganglio >2 cm, pero no >5 cm | Metástasis en un ganglio linfático | Metástasis en un ganglio linfático |
| | N3 | Metástasis en un ganglio >5 cm | NA | NA |
| Metástasis | M0 | No metástasis | No metástasis | No metástasis |
| | M1 | Metástasis a distancia | Metástasis a distancia | Metástasis a distancia |

NA: No Aplica.

3.5 ^{99m}Tc-AuNPs-MAN como sonda para la localización de macrófagos M2 en ambientes tumorales.

Los macrófagos tisulares son las células del sistema inmunológico innato encargadas de patrullar en búsqueda de agentes patógenos, también fungen como células de comunicación en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunitario adaptativo junto a otras células. Los macrófagos se presentan de forma diversa por fenotipo y funciones de acuerdo al tejido en el que se encuentran y al estado de activación, por lo cual, se han denominado M1, M2, inmunoreguladores, etc., desde su espectro de actividades (26).

Dentro de los microambientes tumorales del tejido canceroso, se han descrito macrófagos asociados a tumores o TAMs que desempeñan funciones en la invasión, proliferación y metástasis tumorales, siendo estos los macrófagos conocidos como M2 (27). Los macrófagos M2 poseen altos niveles de receptores de manosa (Abreviado como MR, CD206 o MRC1), mismo que se encuentra en el tejido linfoide y el cual es una glicoproteína transmembranal perteneciente a las lectinas tipo C, también se encuentra en células dendríticas y células endoteliales hepáticas o linfáticas seleccionadas (28). Las regiones extracelulares tienen un dominio rico en cisteína (CR) N-terminal que se une a glicoproteínas con azúcares sulfatados que terminan en 4-SO₄GalNAc, un dominio de fibronectina II (FNII) y ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que se unen a azúcares como manosa y fucosa(26,29,30).

El MR tiene función en la endocitosis, fagocitosis y en la homeostasis inmunitaria al eliminar manoglucoproteínas no deseadas, por ello se está prestando atención a la manosilación de agentes clínicos para imágenes avanzadas, diagnósticos y estrategias terapéuticas optimizando la captación por MR en macrófagos como células diana; tales estrategias podrían permitir el uso de menor cantidad de agente, efectos clínicos óptimos, aumento de la eficacia y reducción en la toxicidad (21).

Para llevar a cabo una localización precisa de los TAMs, se requieren agentes de contraste radiomarcados, el Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc) resulta viable para radiomarcaje debido a la corta vida media de 6.02 horas que tiene y su energía fotónica de 140 keV, así como su disponibilidad a bajo costo (31); además de haber sido usado anteriormente para otros trabajos con fines de bioimágenes, pues la FDA aprobó el “Technetium (99Tc)-labeled tilmanocept” de Navidea Pharmaceuticals como el primer radiofármaco monosilado para obtención de imágenes de Ganglios linfáticos centinela (SLNs) de tumores sólidos (21), es decir, el primer ganglio linfático que drena el tumor primario y se usa en el diagnóstico y pronóstico de pacientes(18).

Al biofuncionalizar, conjugar o revestir NPs, se pueden realizar administraciones dirigidas y controladas, además de servir como sondas para la localización de tumores, células cancerosas y cualquier otra célula u órgano diana, dependiendo del componente agregado; además de poderse sintetizar en tamaños bien definidos y unir diferentes radionúclidos a su superficie (como el ^{99m}Tc) que se prepara con ligandos para el direccionamiento activo en estructuras o células (17,18,31).

Todo esto vuelve viable el dirigirse al MR en macrófagos M2 dentro de ambientes tumorales para el suministro de agentes de imagen y diagnóstico que contienen carbohidratos, función que empleará el complejo ^{99m}Tc -AuNPs-MAN, pues el tamaño de las AuNPs utilizadas está dentro del rango establecido en experimentos de captura de macrófagos (18) y se ha propuesto su uso potencial para el mapeo fotoacústico SLN multimodal, donde se necesita la unión a MR para mejorar la especificidad del método (18,19,21).

IV HIPÓTESIS

La modificación de nanopartículas de oro con manosa y radiomarcadas con tecnecio 99 metaestable permitirá la identificación y localización específica de macrófagos semejantes a M2. Se espera que estas nanopartículas sean reconocidas y capturadas por los receptores de manosa presentes en la superficie de los macrófagos M2, permitiendo una visualización clara y precisa de su ubicación.

V OBJETIVO GENERAL

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro modificadas con manosa y radiomarcadas con tecnecio 99 metaestable.

VI OBJETIVOS PARTICULARES

1. Funcionalizar nanopartículas de oro con moléculas de ácido lipóico (AuNPs-ALA) mediante un proceso de síntesis que permita una eficiente conjugación y estabilización de las nanopartículas.
2. Realizar la unión covalente de moléculas de manosa a nanopartículas de oro con ácido lipóico (AuNPs-MAN) de manera selectiva y eficiente, asegurando una alta pureza y estabilidad del producto final.
3. Caracterizar las propiedades físicas y químicas de los compuestos AuNPs-ALA y AuNPs-MAN mediante técnicas como espectrofotometría UV-Vis para determinar la absorbancia; diámetro hidrodinámico y potencial z para evaluar la estabilidad coloidal; espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para confirmar la presencia de los grupos funcionales; microscopía de efecto túnel (STM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) para observar la morfología y la estructura de las nanopartículas y un análisis elemental para confirmar la composición química.
4. Radiomarcas de manera selectiva y precisa las nanopartículas de oro modificadas con manosa (AuNPs-MAN) y nanopartículas de oro modificadas con ácido lipóico (AuNPs-ALA) con Tecnecio 99 metaestable, utilizando un método de radiomarcaje que garantice una alta pureza

5. Evaluar la eficiencia, pureza y estabilidad radioquímica de los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA mediante el uso de un activímetro, un contador de centello de tipo pozo, cromatografía de capa fina y fórmulas matemáticas.
6. Evaluar la estabilidad radioquímica de los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA en suero humano y en SSI.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Síntesis del compuesto AuNPs-ALA

Se colocó 1 mL de AuNPs de 20 nm de diámetro suspendidas en un buffer de citratos (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) en un tubo eppendorf, se realizaron 3 lavados. Cada lavado consistió en centrifugar el reactivo por 20 minutos a 355488 fuerza centrífuga relativa (RCF) en una centrífuga “Labnet international C2500-R Prism R Refrigerated Microcentrifuge with 24 place rotor, 120V”, retirar 900 μL de sobrenadante y resuspender con 900 μL de agua desionizada a pH 11; el pH en el agua se ajustó con una solución 1M de NaOH (Reactivos Y Productos Químicos Finos, S.A. De C.V.). Posterior a los lavados se agregaron 100 μL de (\pm)- α -ácido lipóico (ALA) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) a 10 mM en etanol anhidro $\leq 0.003\%$ agua (sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) y se dejó 48 hrs. en agitación constante. Al finalizar la incubación, se realizaron otros 3 lavados; como variación únicamente en el primer lavado se retira la mayor cantidad de sobrenadante (aproximadamente 1 mL), en los dos siguientes 900 μL , los dos primeros lavados se realizaron con agua desionizada a pH 11 y en el tercero se utilizó agua desionizada pH7.

7.2 Síntesis del compuesto AuNPs-MAN

Se tomó 1 mL del compuesto AuNPS-ALA pH 7, se agregaron 10 μL de Clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida [EDC] (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) 10 mM suspendido en agua desionizada pH 7 y 2 μL de Clorhidrato 2-Aminoetil 2,3,4,5-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido [Manosa-NH₂] (Synthose Inc, Canadá) a una concentración de 100 mg/mL en etanol anhidro $\leq 0.003\%$ agua (sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). Se dejó en agitación constante durante 5 hrs, posteriormente se realizaron 3 lavados.

7.3 Espectrofotometría UV-Vis

Con ayuda de esta técnica se puede determinar la cantidad de AuNPs prístinas y después de que son funcionalizadas, por ejemplo, si hay una disminución en el pico máximo del espectro de absorción a los 524 nm (longitud de onda en la cual se detectan las AuNPs de 20 nm) del espectro de AuNPs prístinas con respecto a las modificadas se pensaría que hay una disminución en el número de partículas. Además, se puede analizar la estabilidad que presentan las muestras, pues de no ser estable se comenzarán a formar hombros en la curva, que indica una formación de 2 o más grupos de AuNPs diferentes, los cuales tienen un corrimiento al rojo pues las AuNPs al no ser estables interaccionan entre sí agregándose 2 o más en forma de racimo y actuando como una unidad; inclusive en algunas ocasiones es posible observar la presencia de nuevas moléculas funcionalizadas debido a un incremento en el tamaño de la curva sin pérdida de material.

Para determinar los espectros UV-Vis se utilizó un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek Instruments, Alemania). Se analizaron muestras de 100 μ L de los complejos AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN colocadas en una placa 96 well cell culture cluster (Costar, NY, USA) por medio de un barrido de 300 a 700 nm.

7.4 Diámetro Hidrodinámico

El diámetro hidrodinámico se refiere al tamaño promedio aparente de las nanopartículas en solución (32). Las AuNPs prístinas tienen un diámetro de 20 nm y están conformadas por un aproximado de 246,762 átomos de oro (33). Sin embargo, debe considerarse que en solución normalmente se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie o interactúan 2 o más AuNPs juntas, por lo cual la medición del diámetro hidrodinámico provee la información promedio del diámetro final tras estas interacciones (32), a su vez permite apreciar el aumento de tamaño tras las respectivas funcionalizaciones realizadas.

Para determinar el diámetro hidrodinámico se usó el equipo 90 Plus Particle Size Analyser (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A.) ubicado en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Se utilizaron 10 μ L de nanoesferas de poliestireno como

estándar de referencia (Duke Scientific U.S.A.) suspendidas en 2 mL de KCl 10 mM para verificar el funcionamiento del equipo.

La técnica se realizó para AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN, tomando 500 μ L de la muestra y 1 mL de KCl 10 mM ajustado a pH 7 con NaOH 1M previamente filtrado con un filtro de membrana Durapore (Millex Gv, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda) de 0.22 μ m.

7.5 Potencial zeta

Por otro lado, el potencial Z se refiere a la carga eléctrica en la superficie de las partículas y su capacidad para repeler o atraer a otras; por lo general se identifica con la letra griega θ o ϑ (zeta) (34), estudios previos han demostrado que las AuNPs funcionalizadas con ácidos carboxílicos exhiben valores de potencial zeta negativos cercanos a -60 mV (35). Un potencial z negativo indica una superficie cargada negativamente, lo que refiere que este tipo de carga en AuNPs funcionalizadas con ácidos carboxílicos indica estabilidad coloidal en solución.

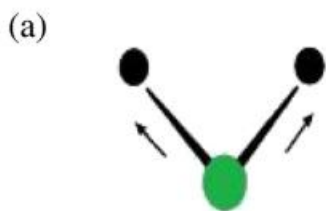
Para determinar el potencial zeta, de igual manera se usó el equipo 90 Plus Particle Size Analyser (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A.) ubicado en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Se utilizó un electrodo de paladio con una celda de acrílico de cuatro lados claros. El estándar para la técnica fue una solución de BI-ZR3 Zeta en una disolución de KCl 1 mM.

La técnica se realizó para AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN, tomando 500 μ L de la muestra y 1 mL de KCl 10 mM ajustado a pH 7 con NaOH 1 M previamente filtrado con un filtro de membrana Durapore (Millex Gv, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda) de 0.22 μ m.

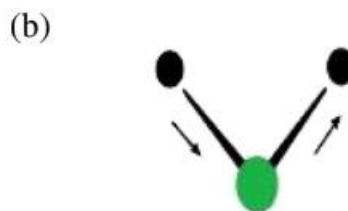
7.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR toma como principio que las moléculas tienen la capacidad de rotar y vibrar en distintas frecuencias denominadas modos normales vibracionales tras absorber la energía de fotones en el rango energético de la espectroscopía infrarroja debido a una diferencia en el momento dipolar de la molécula (36). El resultado del análisis es un espectro de reflexión de las bandas de grupos funcionales de las sustancias inorgánicas

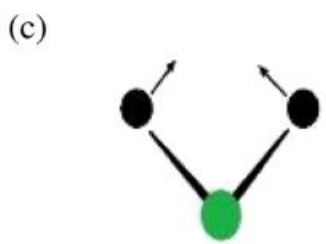
y orgánicas, haciendo posible una identificación de los materiales presentes en la muestra (37).



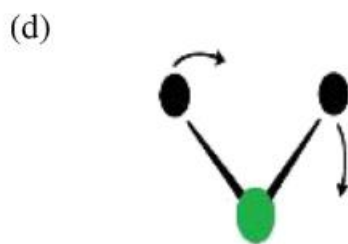
Vibración de estiramiento simétrica



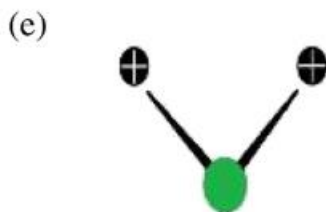
Vibración de estiramiento antisimétrica



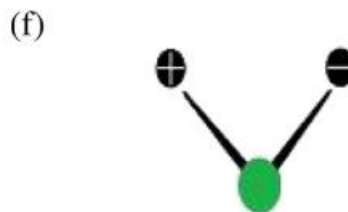
Tijereteo en plano



Balanceo en plano



Aleteo fuera del plano



Torsión fuera del plano

Figura 3. “Diferentes modos de vibración de estiramiento ejemplificados con un grupo CH_2 que incluyen: (a) Vibración de estiramiento (o tensión) simétrica, (b), vibración de estiramiento (o tensión) asimétrica; y vibraciones de doblamiento (o flexión) que incluyen: (c) tijereteo en plano, (d) balanceo en plano, (e) aleteo fuera del plano, (f) torsión fuera del plano. Los círculos negros representan átomos de hidrógeno y los círculos verdes representan átomos de carbono.” Imagen modificada y pie de figura tomados de (38).

Cada banda mostrada en el espectro de reflexión puede pertenecer a un tipo diferente de vibración como se muestra en la **Figura 3**, debido a ello es que podemos encontrar

diferentes a un mismo grupo funcional, e inclusive en algunos casos se requieren estar presentes más de una banda para indicar la presencia de un grupo funcional en concreto como es el caso de la amida secundaria que requiere un total de 3 bandas para confirmar su presencia (39).

Para la técnica FTIR se utilizó el espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk. Ct. EE. UU.) ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares (ICN), UNAM. El análisis se realizó para AuNPs y AuNPs-ALA, para ello se tomó 1 mL de la muestra y se centrifugó a 355488 RCF en una centrífuga “Labnet international C2500-R Prism R Refrigerated Microcentrifuge with 24 place rotor, 120V” por 20 min., posteriormente se retiraron 950 μ L de sobrenadante. Posteriormente los 50 μ L restantes se secaron gota a gota en una superficie de cuarzo para su análisis en el equipo.

Se hizo un análisis extra para el glucósido ALA-MAN sin NPs aumentando 20 veces la concentración de la muestra y dejándolo secar gota a gota en una superficie de cuarzo y usando el mismo equipo.

7.7 Microscopía de efecto túnel (STM)

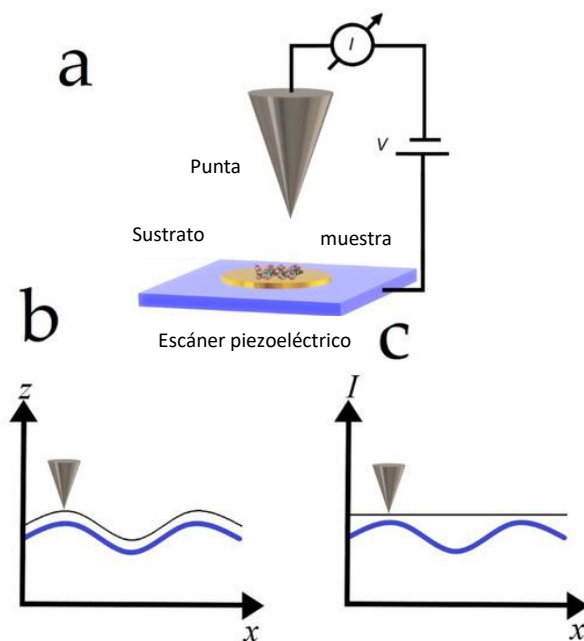


Figura 4. Componentes y principios básicos de un STM. El STM aplica un voltaje de polarización y recoge la corriente de túnel entre el vértice de la punta y la muestra (a). La punta está

conformada por una aleación entre platino e iridio; es la sonda de detección física con una punta muy afilada, la punta ideal es la que tiene un solo átomo en el ápice, con la que se pueden obtener imágenes de resolución atómica. El equipo tiene dos modos de funcionamiento, corriente constante (b) y altura constante (c). Imagen tomada de (40).

La STM es usada como caracterización de superficies con resolución atómica, consiste en mover controladamente una aguja conductora sobre la superficie de la muestra a una corriente de túnel constante, con lo cual permite analizar cambios en la topografía y variación de altura de barrido (**Figura 4**) (41,42).

Para realizar esta técnica se utilizó el equipo easyScan E-STM (NanoSurf, Liestal, Suiza). Las muestras analizadas fueron la superficie de grafito donde se colocaron las muestras, AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN. En una superficie de hojas de grafito se colocó una gota de muestra del tamaño de la superficie total del mismo y se dejó secar por 24 hrs para su posterior observación.

7.8 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de Barrido (SEM), utiliza un haz de electrones para formar la imagen a partir de la muestra, la cual en la mayoría de las ocasiones únicamente se requiere que sea conductora, tiene una gran profundidad de campo y produce imágenes de alta resolución (43).

Se utilizó el microscopio electrónico de barrido SEM 7800 ubicado en el Instituto de Física, UNAM. El análisis se realizó a muestras de 1 mL de AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN para ello se centrifugaron a 355488 RCF en una centrifuga “Labnet international C2500-R Prism R Refrigerated Microcentrifuge with 24 place rotor, 120V” por 20 min., se retiraron 900 μ L de sobrenadante y los 100 μ L restantes se enviaron al instituto para su análisis.

7.9 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

La microscopía electrónica de transmisión es usada para el análisis y visualización de muestras entre los micrómetros y los nanómetros por medio de imágenes de alta resolución obtenidas a partir del enfoque de electrones de alta energía (44). Esta

microscopía resulta útil en la caracterización de materiales nanoestructurados y provee información acerca de la distribución de átomos en un material con alta resolución espacial, además de conservar la integridad de los materiales (45).

Se utilizó el microscopio electrónico de transmisión JEOL 2010 FEG FASTEM ubicado en el Instituto de Física, UNAM. El análisis se realizó a muestras de 1 mL de AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN, para ello se centrifugaron a 355488 RCF en una centrifuga “Labnet international C2500-R Prism R Refrigerated Microcentrifuge with 24 place rotor, 120V” por 20 min., se retiraron 900 μ L de sobrenadante y los 100 μ L restantes se enviaron al instituto para su análisis.

7.10 Análisis elemental

El análisis elemental se llevó a cabo por el Instituto de Física, UNAM. Para ello, el personal del instituto utilizó las mismas muestras enviadas para su análisis por HRTEM y fueron recibidas posteriormente.

7.11 Síntesis del compuesto HYNIC-AuNPs-MAN y HYNIC-AuNPs-ALA

La funcionalización con HYNIC y el radiomarcado se realizaron con base en (46). Se tomó 1 mL del compuesto AuNPs-MAN pH 11 y se agregaron 5 μ L de Hidrazinonicotinamida-Glicina-Glicina-Cisteína (HYNICGGC) (Peptides International, Kentucky, USA) 1mM en etanol \leq 0-003% agua (sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). Se dejó en agitación constante por 20 min. Al finalizar se realizaron 3 lavados. El mismo proceso se realizó para el compuesto AuNPs-ALA pH 11, que sustituye al compuesto AuNPs-MAN pH 11 en la metodología descrita previamente.

7.12 Radiomarcado de los compuestos HYNIC-AuNPs-MAN y HYNIC-AuNPs-ALA con ^{99m}Tc

Primero se desgasificaron las disoluciones de Cloruro de Estaño (SnCl_2) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), 10 mM, ácido etilendiamino-N, N'- diacético (EDDA) (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA) 20 mM, Tricina (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA) 30 mM y Solución Salina Isotónica (SSI) (Pisa, México) por 15 min. con Nitrógeno gaseoso. Posteriormente se tomaron 0.5 mL de pertecnetato de sodio 1 milicurio (mCi), 60 μ L de SnCl_2 10 mM pH 1 y 2 μ L de ácido clorhídrico (HCl) (Fermont, Monterrey, México), 12 N; se incubó a 30°C

por 15 min. con agitación de 500 rpm (Multi-Therm, heat – shake, Benchmark). Se ajustó el pH a 7 con NaOH (Reactivos Y Productos Químicos Finos, S.A. De C.V.) 1M. se agregaron 40 µL de Tricina 30 mM (en PBS 0.1 M pH 7.4) y se incubó nuevamente durante 10 min. a 30°C con agitación de 500 rpm. Finalmente, se agregaron 40 µL de EDDA 20 mM (en PBS 0.1 M pH 7.4) y 1 mL de HYNIC-AuNPs-MAN, se incubó por 20 min. a 100°C con agitación de 500 rpm. Se realizó el mismo proceso para el compuesto HYNIC-AuNPs-ALA, que sustituye al compuesto HYNIC-AuNPs-MAN en la metodología descrita previamente.

7.12.1 Eficiencia de radiomarcado

Las muestras radiomarcadas se caracterizaron analizando la actividad del sobrenadante y la pastilla de ^{99m}Tc-AuNPs-MAN en un activímetro (34-056 Deluxe Iotope Calibrator II, Nuclear Associates, Division of Victoreen. INC.) ubicado en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). La eficiencia de radiomarcado de cada muestra se realizó centrifugando en un tubo Amico Ultra (0.5 mL Ultracel - 100 K), por 5 min. A 88872 RCF (Centrífuga MiniSpin Plus. Eppendorf AG, Alemania). Con los datos recolectados del equipo se efectuó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia del radiomarcado} = \frac{A \text{ Pastilla}}{A \text{ Pastilla} + B \text{ Sobrenadante}} \times 100$$

Se aplicó el mismo proceso para el compuesto ^{99m}Tc-AuNPs-ALA, el cual sustituye a ^{99m}Tc-AuNPs-MAN en la metodología descrita previamente.

7.12.2 Pureza del radiomarcado

Para determinar la pureza del radiomarcado se utilizó una cromatografía en capa fina (ITLC SG. PALL Corporation), la fase móvil fue SSI. Se colocaron 2 µL de ^{99m}Tc-AuNPs-MAN en la tira de ITLC y se dejó eluir en la SSI, después se cortó por la mitad y se midió la radioactividad en la sección inferior (bottom) y superior (el top) en un contador de centelleo de tipo pozo (modelo 2200 scaler ratemeter, LUDMUM) ubicado en el INCan. La pureza se determinó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Pureza del radiomarcado} = \frac{A \text{ bottom}}{A \text{ bottom} + B \text{ top}} \times 100$$

Se aplicó el mismo proceso para el compuesto ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, el cual sustituye a ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en la metodología descrita previamente.

7.12.3 Estabilidad del radiomarcado

Para determinar la prueba de estabilidad del radiomarcado se utilizó suero humano a 37°C y SSI a temperatura ambiente. Se agregaron $100\ \mu\text{L}$ de ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en un tubo con $500\ \mu\text{L}$ de suero humano y en un tubo con $500\ \mu\text{L}$ de SSI. Las pruebas se realizaron por triplicado. Los tubos con suero se colocaron en un Multi-therm (heat-sheake, Beamchmarck) a 37°C por 6 hrs a 300 rpm, mientras que las muestras en SSI se pusieron en agitación constante a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a las 0, 0.5, 1, 2, 4 y 6 hrs. La estabilidad radioquímica se determinó mediante cromatografía de capa fina (ITLC SG. PALL Corporation) tal como se realizó en la determinación de pureza; la fase móvil fue SSI. La estabilidad del radiomarcado se determinó en términos de porcentaje de radiactividad presente en el coloide (El bottom) en distintos tiempos. Se aplicó el mismo proceso para el compuesto ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, el cual sustituye a ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en la metodología descrita previamente.

VIII RESULTADOS

8.1 Caracterización

8.1.1 Espectrofotometría UV-Vis

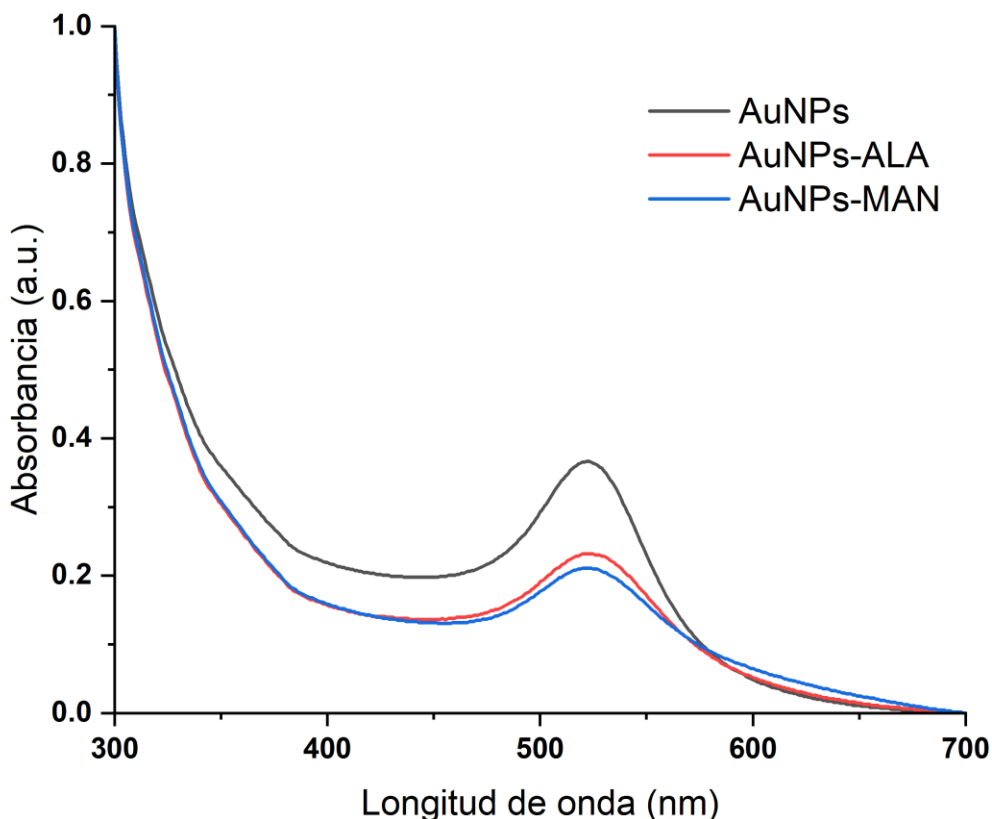


Figura 5. Gráfico normalizado de las muestras AuNPs (línea negra), AuNPs-ALA (línea roja), y AuNPs-MAN (línea azul), analizadas por espectrofotometría UV-Vis de un barrido de 300-700 nm. Para las 3 muestras, el pico de absorbancia se encontró en 524 nm.

En la **Figura 5** se muestran los resultados normalizados obtenidos tras analizar 3 muestras correspondientes a AuNPs (línea negra), AuNPs-ALA (línea roja), y AuNPs-MAN (línea azul) cuyos picos de absorbancia de las 3 muestras se encontraron en 524 nm. Siguiendo los pasos de síntesis de los compuestos, en un inicio las AuNPs muestran estabilidad por tratarse de un reactivo comercial en buffer de citratos, posterior a su funcionalización con ALA, la cantidad de AuNPs disminuyó teniendo como precedente

de esto los lavados, en donde pudo haber pérdida de material en el sobrenadante. Finalmente, la funcionalización con MAN mostró una disminución mínima en material con respecto a la de ALA, sin embargo, no mostró inestabilidad en la muestra. A pesar de no haber un aumento en la absorbancia en esta metodología que nos indique una funcionalización, se recurrieron a otras técnicas para corroborar este hecho.

8.1.2 Diámetro hidrodinámico y Potencial Z

En la **Tabla 2** se observan los resultados (n=3) de las muestras AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN, las cuales tienen un aumento gradual en diámetro respecto a la funcionalización. En la muestra de AuNPs, se inicia con un diámetro promedio entre 28.6 nm y 29.5 nm a pesar de medir 20 nm debido a la capa eléctrica dipolar interaccionando con las AuNPs desnudas, posterior a la funcionalización con ALA, la muestra AuNPs-ALA presenta una elevación en diámetro promedio que va de los 36.6 nm a los 44.8 nm, indicando el primer indicio a una funcionalización exitosa, hecho que vuelve a verse presente tras la unión covalente entre MAN y ALA, pues el análisis de la muestra AuNPs-MAN arroja resultados promedio desde 62.3 nm a 63.1 nm.

Por otro lado, el Potencial Z en la muestra de AuNPs, los valores rondan de -11.97 a -14.05 mV, los cuales disminuyen de manera gradual tras las funcionalizaciones hasta la muestra AuNPs-MAN, donde se establecen de -38.79 a -47.06 mV, acercándose a los -60 mV establecidos en la literatura en una funcionalización estable con ácidos carboxílicos. Ambos análisis a las muestras establecen la primera pauta para confirmar una funcionalización exitosa.

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico y Potencial Z por triplicado de muestras de AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN

| | Diámetro Hidrodinámico (nm) | Potencial Z (mV) |
|------------------|-----------------------------|------------------|
| AuNPs | 29.5 ± 0.4 | -13.78 ± 4.07 |
| | 28.9 ± 0.2 | -11.97 ± 0.87 |
| | 28.6 ± 0.3 | -14.05 ± 4.85 |
| AuNPs-ALA | 37.6 ± 1.6 | -30.35 ± 27.32 |
| | 44.8 ± 0.8 | -28.07 ± 32 |

| | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| | 36.6 ± 1.6 | -46.2 ± 31.81 |
| AuNPs-MAN | 63.1 ± 0.4 | -47.06 ± 4.2 |
| | 62.4 ± 0.7 | -38.79 ± 3.51 |
| | 62.3 ± 0.2 | -46.69 ± 2.93 |

8.1.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

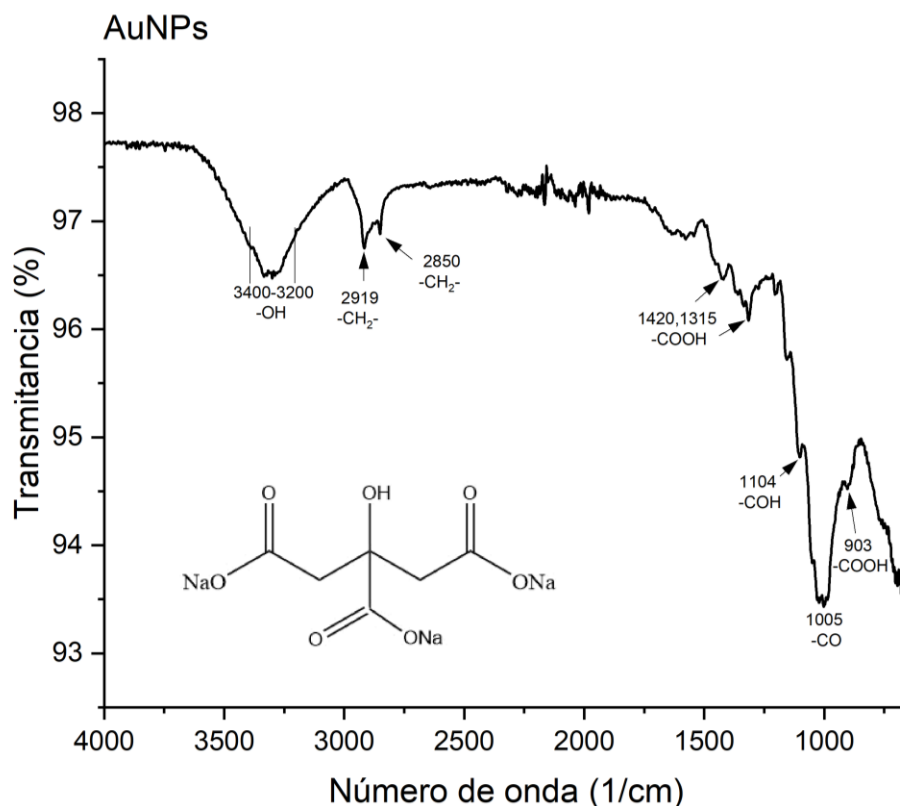


Figura 6. FTIR de muestra de AuNPs de 20 nm en citrato de sodio.

En la **Figura 6** y la **Tabla 3** ubicada en los anexos, se observa el FTIR y su análisis de la primera muestra correspondiente a AuNPs de 20 nm suspendidas en citrato de sodio y la estructura química de este último. Esta muestra fue el reactivo comercial obtenido para el proyecto, el cual se corroboró mediante la presencia de bandas correspondientes a la molécula, pues ésta presenta un grupo OH terciario en carbono 3, correspondiente a la banda ancha presente en el rango $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$, la cual es indicativa de un grupo OH y la banda presente en 1104 cm^{-1} que nos especifica que se trata de un alcohol

terciario; a su vez se encontraron dos bandas en 2919 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} , correspondientes a estiramientos del grupo CH_2 ; una sola banda para un grupo CO , el cual está presente en 1005 cm^{-1} y puede indicar que el citrato de sodio se encuentra desprotonado; finalmente tenemos el grupo carboxilo que en primera instancia presenta una torción y estiramiento, corroborados con dos bandas, una en 1315 cm^{-1} y otra más débil en 1420 cm^{-1} , también este mismo grupo presenta otra torsión en 903 cm^{-1} . Tomando en cuenta la suma de bandas, se puede inferir la presencia del citrato de sodio.

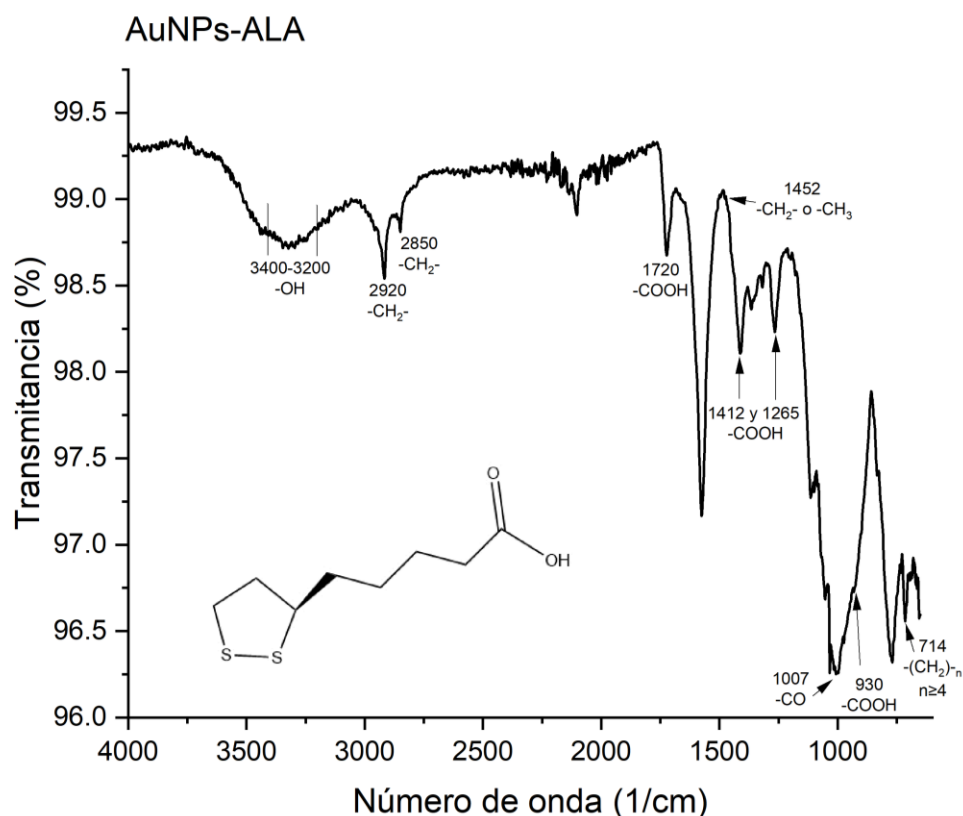


Figura 7. FTIR de una muestra de AuNPs-ALA.

El análisis del FTIR de la muestra AuNPs-ALA se muestra en la **Figura 7** y en la **Tabla 4** ubicada en los anexos, junto a su estructura química y los grupos que se esperan encontrar. Al igual que la muestra anterior, el primer valor encontrado corresponde al grupo OH en el rango $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, asociado al grupo carboxilo de la molécula, el cual confirma su presencia por medio de 3 estiramientos diferentes, el primero se encuentra en 1720 cm^{-1} , el segundo en 930 cm^{-1} y un tercero que se encuentra entre los dos anteriores pero que se conforma de dos bandas pues es de torción/estiramiento, la

primera banda se encuentra en 1265 cm^{-1} y la segunda en 1412 cm^{-1} , dentro de la literatura se establece que la banda de menor número de onda es de mayor tamaño que la otra, sin embargo, en la **Figura 7** se muestran inversas, debido a esta incertidumbre se tomó la medida de la transmitancia de ambas bandas desde la base hasta la punta de ésta; para la banda registrada en 1265 cm^{-1} la transmitancia fue de 0.45, mientras que para la banda registrada en 1412 cm^{-1} la transmitancia fue de 0.39, con lo cual se confirma el registro en la literatura a pesar de aparentar lo contrario; continuando con el análisis, el enlace del grupo CO en el carboxilo se encuentra en la banda registrada en el número de onda 1007 cm^{-1} ; finalmente, se analizó una cadena de más de 4 carbonos, para ello se utilizó un algoritmo de 4 bandas, la primera se encuentra en 2920 cm^{-1} correspondiente a un estiramiento asimétrico de un carbono secundario (CH_2), seguida de un estiramiento en 2850 cm^{-1} del mismo grupo corroborando la presencia de éste, posteriormente en 1452 cm^{-1} se presenta otra banda, la cual indica la presencia de una cadena de carbonos en la molécula y ésta puede presentar únicamente grupos CH_2 o bien finalizar con un grupo CH_3 , esta banda no especifica la cantidad de carbonos, para ello se encontró una cuarta banda ubicada en 714 cm^{-1} , que de acorde al algoritmo, indica que la cadena posee únicamente grupos CH_2 y que tiene un número de carbonos mayor a 4, siendo favorable para la identificación de la molécula funcionalizada junto a las AuNPs.

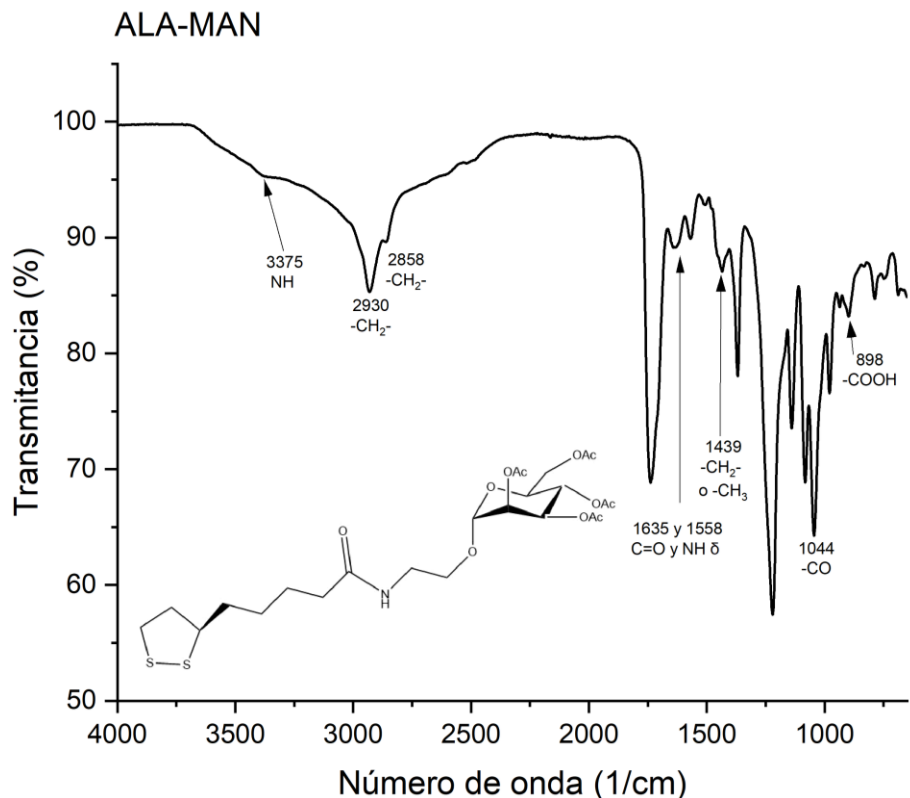


Figura 8. FTIR de una muestra de ALA-MAN.

El último análisis se realizó para el glucósido ALA-MAN con una concentración 20 veces mayor a la utilizada para llevar a cabo la reacción en 1 mL de muestra de AuNPs-ALA, pues la muestra AuNPs-MAN tenía una concentración muy baja como para que la registrara correctamente el equipo. El análisis FTIR para el glucósido ALA-MAN se encuentra en la **Figura 8** y la **Tabla 5** ubicada en los anexos, dentro de la cual se encontró una banda en 1044 cm^{-1} correspondiente al grupo CO el cual forma parte de la estructura de la manosa utilizada, y una única banda en 898 cm^{-1} correspondiente a una torsión de un grupo carboxilo que, si bien ya no está presente posterior a la reacción, la presencia de esta banda podría indicar que la reacción ALA-MAN no es 100% eficiente, pues el grupo carboxilo se encuentra en el ALA libre, por lo cual indica la presencia de moléculas de ALA no funcionalizadas; continuando con el análisis, se utilizó el algoritmo descrito para el FTIR de AuNPs-ALA para establecer una cadena de 4 carbonos, sin embargo, se encontraron 3 de 4 bandas para este algoritmo. La primera se encuentra en 2930 cm^{-1} y corresponde a un estiramiento asimétrico del grupo CH₂, seguida de otra banda en 2858 cm^{-1} correspondiente a un estiramiento del mismo grupo; la 3ra banda la

encontramos en 1439 cm^{-1} e indica la presencia de una cadena únicamente de CH_2 o que termine en CH_3 , pero no se puede confirmar el número de carbonos ni descartar la terminación en CH_3 debido a la ausencia de una 4ta banda entre los rangos $730\text{-}710\text{ cm}^{-1}$, se infiere que fue cubierta por ruido ambiental captado por el equipo o por otra banda mayor ubicada en la MAN utilizada; finalmente las bandas que confirman que ocurre la reacción ALA-MAN corresponden a una amida secundaria, la cual para comprobar su presencia se requieren tres bandas, de las cuales dos bandas se asocian al estiramiento del grupo NH de la amida secundaria y se ubicaron en 3375 cm^{-1} y 1568 cm^{-1} , mientras que la 3er banda corresponde al estiramiento del grupo carbonilo dentro de la amida secundaria ubicado en 1635 cm^{-1} . La presencia de una amida secundaria en la muestra únicamente se da si la reacción se llevó a cabo eficientemente o de manera parcial.

8.1.4 Microscopía de efecto túnel (STM)

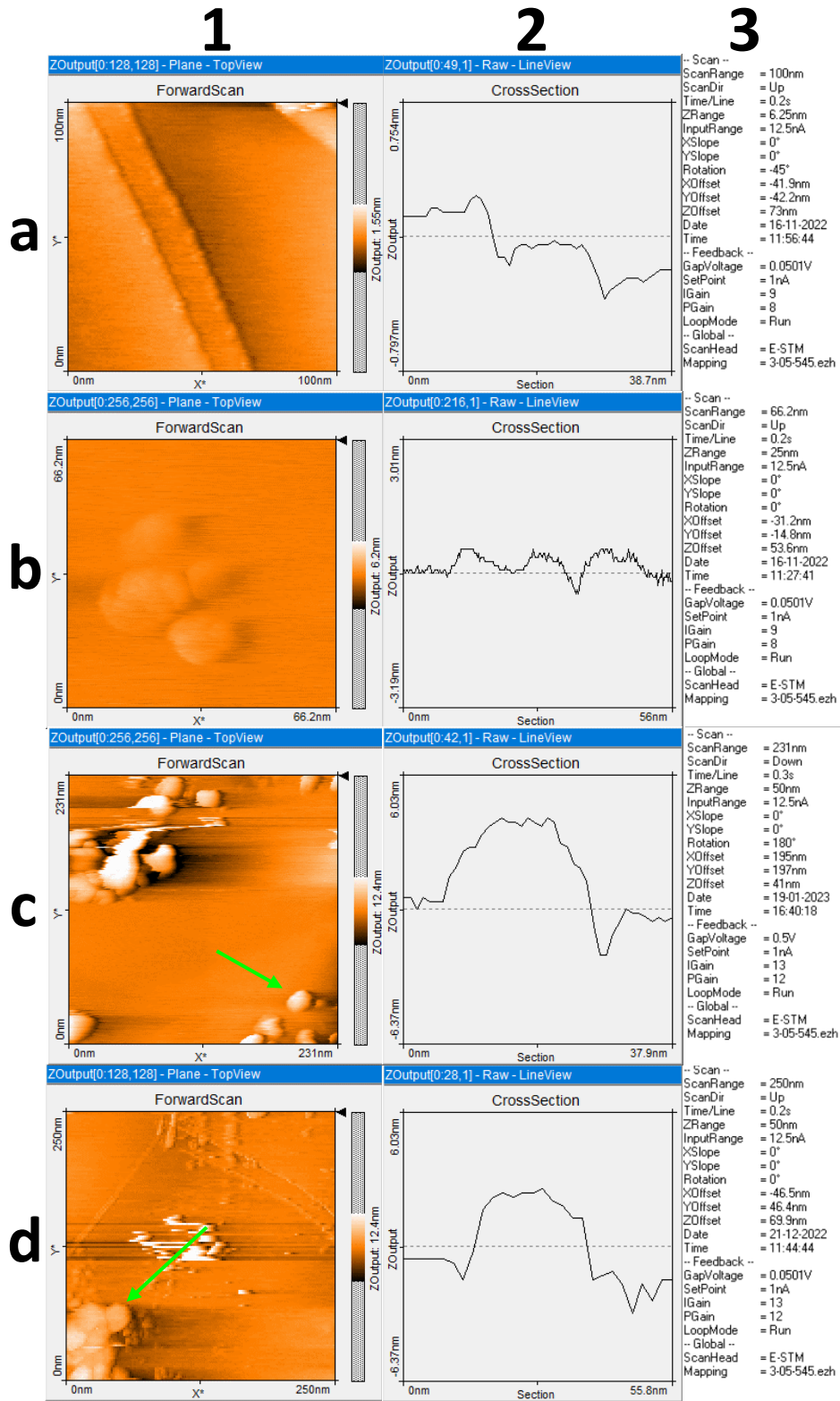


Figura 9. Análisis de muestras en STM. Fila a: Superficie de grafito, fila b: AuNPs, fila c: AuNPs-ALA, fila d: AuNPs-MAN. Columna 1: imagen obtenida, columna 2: topografía de la muestra, columna 3: datos con los que fueron tomadas las imágenes. Las flechas verdes señalan la parte de interés de la imagen.

En la **Figura 9** se observan las imágenes obtenidas por STM de las muestras. En la imagen 1a se aprecia la superficie de grafito usada como base para montar las muestras y puede contener algunos defectos, en este caso se aprecian “escalones de grafito”, corroborado con la imagen 2a, en donde la topografía presenta un nivel continuo, seguido por un declive y se repite la secuencia 2 veces. Aunque no es el único defecto que puede haber, fue el que persistió durante las observaciones. La primer muestra analizada fue de AuNPs prístinas ubicadas en la imagen 1b, éstas presentan una topografía (imagen 2b) semiesférica de ~20 nm, con un aparente superficie lisa, fueron encontradas en conjunto de 3, donde la central presenta dos conglomerados unidos a ella, no presentan ningún indicio de funcionalización con ninguna partícula en su superficie. En la muestra de AuNPs-ALA ubicada en la imagen 1c se tiene un mejor perfil topográfico (imagen 2c) casi esférico con una longitud de ~20 nm, seguido de una partícula conglomerada, la cual puede ser un exceso de ALA que puede deberse a una reacción incompleta o ineficiente durante la síntesis de las AuNPs-ALA, y al ser una gran cantidad de partículas, se observan como una aparente esfera, sin embargo en el perfil topográfico vemos que no tiene altura en Z. Finalmente, la imagen 1d corresponde a la muestra de AuNPs-MAN, donde se presenta un conglomerado de múltiples AuNPs, se aprecia una en particular en la zona superior derecha del conglomerado, sigue conservando su estructura semiesférica (imagen 2d), el tamaño de ~20 nm, su superficie ya no es lisa y se observa rugosidad, por lo cual se sugiere que existen moléculas en su superficie y pueden pertenecer al glucósido ALA-MAN adsorbido a la superficie de las AuNPs, siendo los grupos azufre del ALA el punto de unión con la AuNP.

8.1.5 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

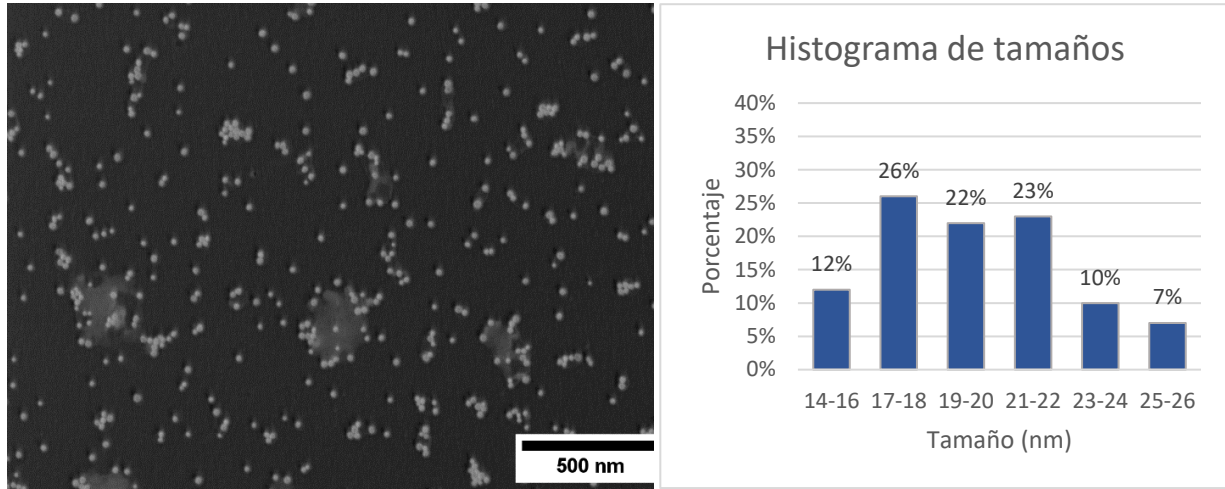


Figura 10. AuNPs observadas por SEM e histograma de distribución de tamaños.

En la **Figura 10** se analizó por SEM una muestra de AuNPs prístinas en citrato de sodio (reactivo comercial), se observaron en su mayoría AuNPs individuales, sin embargo, en las zonas donde aún había presencia del solvente predominaban los conglomerados de 2 o más AuNPs; se hizo un histograma de tamaños de las AuNPs de manera individual, observando una predominancia del 26% los tamaños entre 17-18 nm, seguido por un 23% en las medidas 21-22 nm y 22% entre los tamaños 19-20 nm, al obtener la media de tamaño, se registró en 20.21 nm.

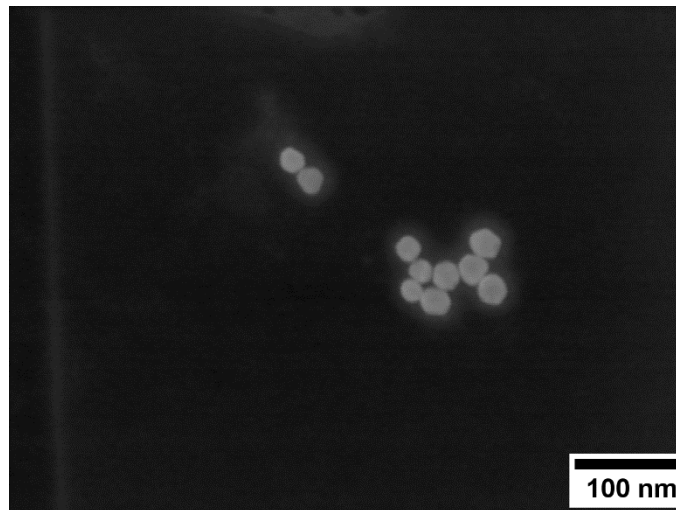


Figura 11. AuNPs-ALA observadas por SEM.

En la muestra de AuNPs-ALA observada por SEM (**Figura 11**), se observó un anillo de aproximadamente de 10 nm rodeando a las AuNPs de manera uniforme; a diferencia de la **Figura 10** que presenta restos de citrato de sodio, el cual está distribuido en formas desiguales, en la **Figura 11** las medidas se respetan alrededor de toda la AuNPs, este anillo se asocia a la funcionalización que se realizó con ALA.

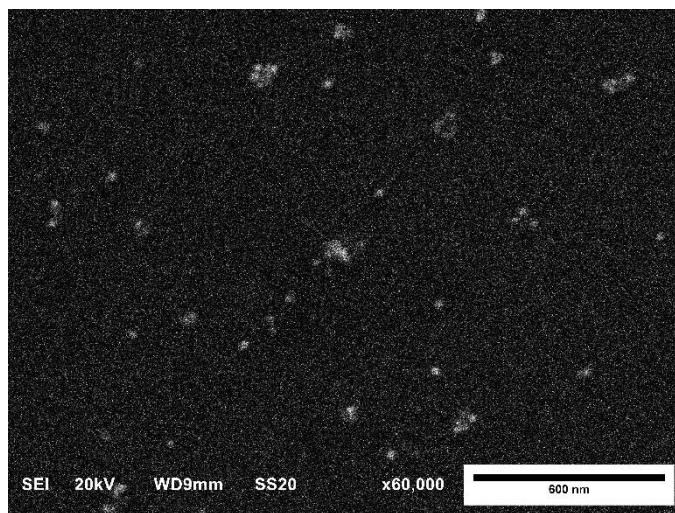


Figura 12. AuNPs-MAN observadas por SEM.

En la **Figura 12**, se analizaron las AuNPs-MAN por medio de SEM, dentro de la imagen se observan diversas AuNPs funcionalizadas que están de manera solitaria, esto debido a que el proceso de funcionalización rodea a las AuNPs con moléculas orgánicas (ALA-MAN), por lo cual se evita que interactúen entre sí formando grupos de éstas; sin embargo, al observar la presencia de algunos conglomerados, se intuye que se formaron previo a este paso y no son indicadores de inestabilidad en la muestra.

8.1.6 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

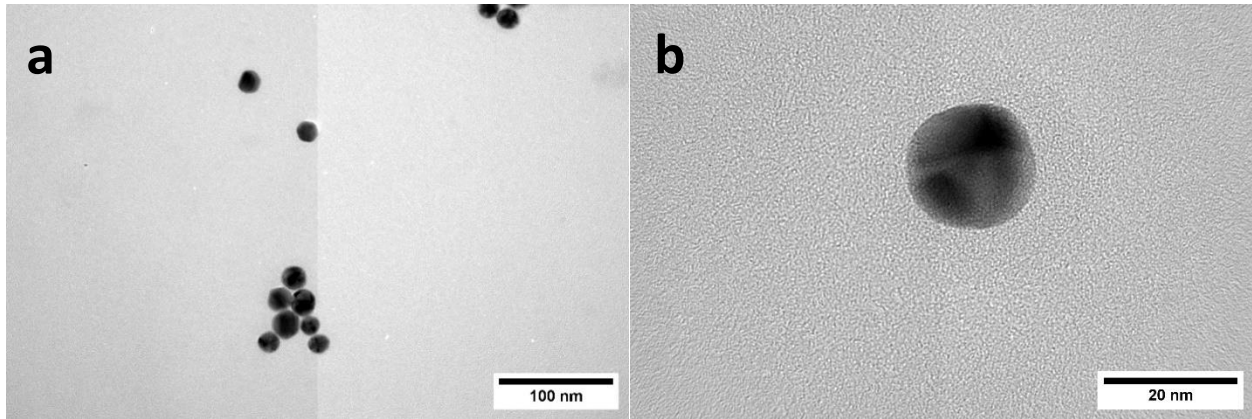


Figura 13. AuNPs analizadas por HRTEM.

Las AuNPs en citrato de sodio en la **Figura 13** imagen a, se aprecia su morfología con mayor resolución incluso que la obtenida por STM, las AuNPs son semiesféricas y no hay indicativos de funcionalización con moléculas, cabe destacar que se observaron una gran cantidad de AuNPs solitarias y un número de agregados muy bajo. En la imagen b, se observa una AuNP que mide 19.72 nm, presenta algunas irregularidades en el tono de su superficie que pueden deberse a la misma microscopía o irregularidades de fábrica.

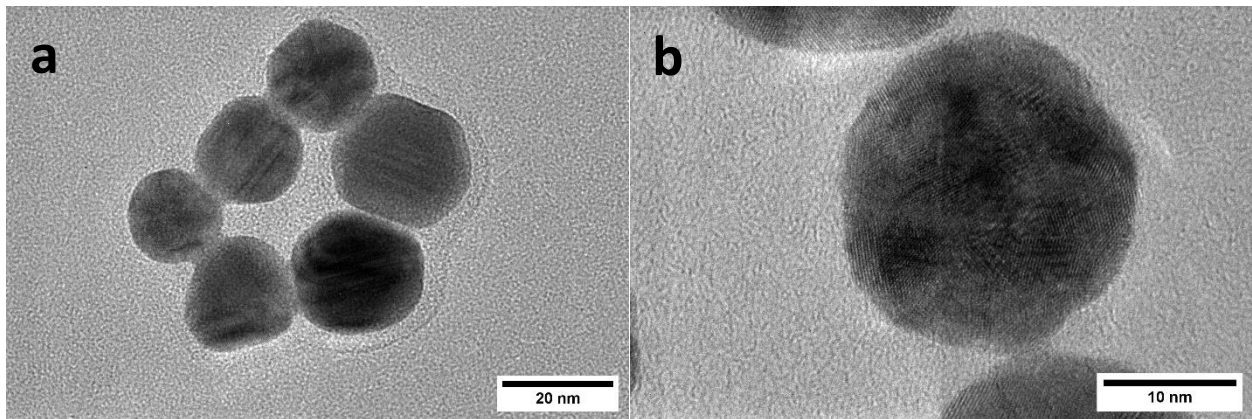


Figura 14. AuNPs-ALA analizadas por HRTEM.

Las AuNPs-ALA presentes en la **Figura 14** imagen a, siguen conservando una forma semiesférica, con algunas irregularidades, las cuales provienen de fábrica, sin embargo,

se hace presente un halo alrededor de las AuNPs, éste halo se le atribuye a la funcionalización con ALA y tiene una distancia ~ 3.19 nm respecto a la superficie de la AuNP, este halo ya se había hecho presente en las muestras funcionalizadas durante otras microscopías como sucedió en la **Figura 11**; por otro lado, en la imagen b, se tiene un acercamiento a una AuNP-ALA de 22.54 nm, en esta su halo es apenas visible del lado central derecho de la imagen con una longitud de ~ 3.24 nm respecto a la superficie de la AuNP.

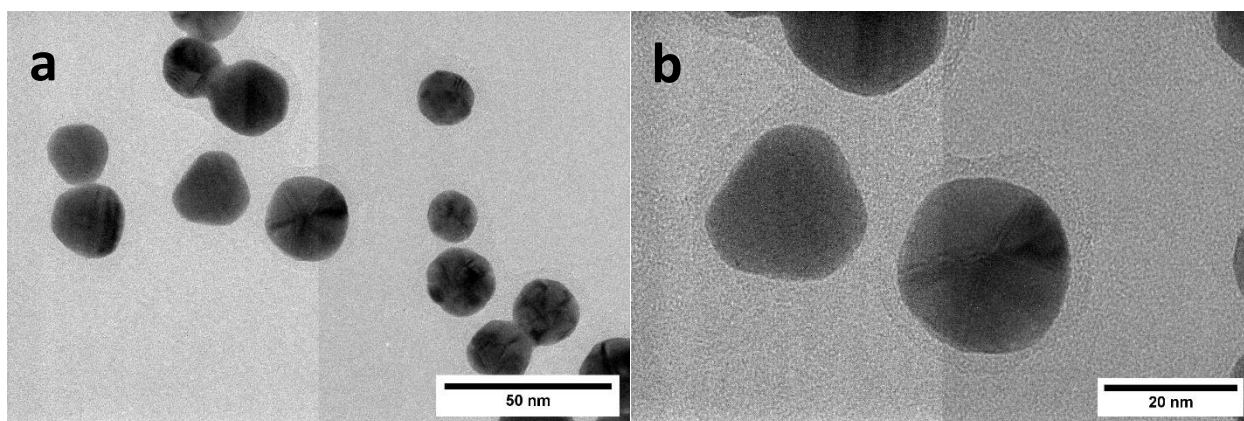


Figura 15. AuNPs-MAN analizadas por HRTEM.

Finalmente, en la **Figura 15** imagen a, se observan las AuNPs-MAN, las cuales presentan un halo más evidente alrededor de sí mismas que en la **Figura 14**, la morfología permanece sin alteraciones durante el proceso de funcionalización, sin embargo, se encuentran formas tetraédricas y hexagonales además de las circulares en las AuNPs. La medida del halo es de ~ 6.12 nm; para la imagen b, se observan dos AuNPs, la presente del lado izquierdo tiene 23.18 nm de diámetro con un halo de ~ 4.48 nm, mientras que la AuNP de la derecha, tiene 25.55 nm de diámetro con un halo de ~ 5.13 . En comparación a los halos de la **Figura 14**, en la **Figura 15** aumentaron de tamaño, pudiendo atribuirlo al alargamiento de longitud en las moléculas unidas a la AuNP, pues aquí tenemos al ALA, unido por un enlace tipo amida a una MAN-NH₂.

8.1.7 Análisis elemental

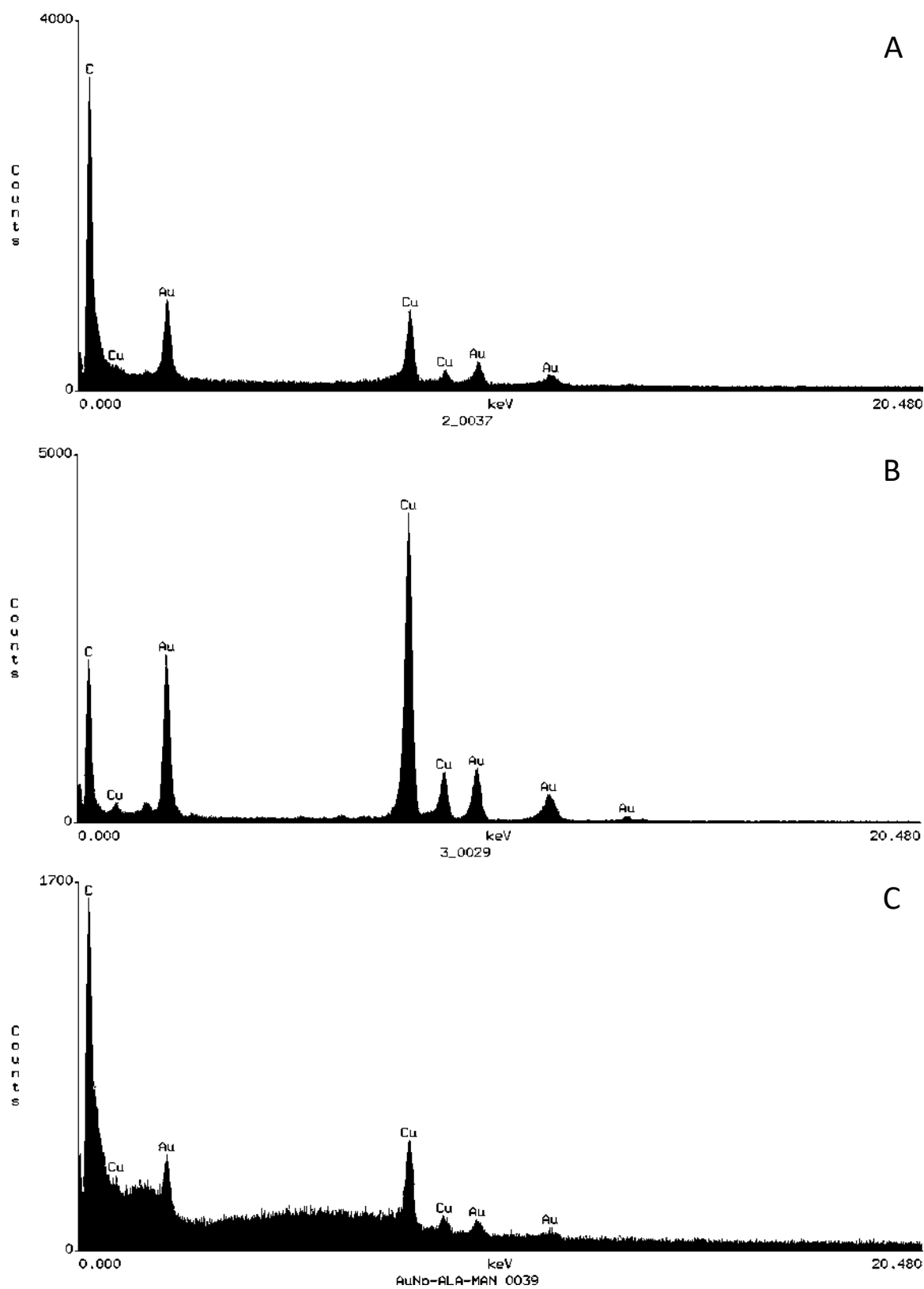


Figura 16. Análisis elemental. A: AuNPs; B: AuNPs-ALA; C: AuNPs-MAN.

El análisis elemental presentado en la **Figura 16** muestra únicamente carbono (C), cobre (Cu) y oro (Au); la presencia de Cu en las tres muestras se debe al soporte utilizado para el análisis, el Au está relacionado a las AuNPs, finalmente el C corresponde a las moléculas orgánicas existentes. En la imagen A, el citrato de sodio y las trazas de grasa de vacío presentes en el quipo pudieron hacer que la banda correspondiente al C, se viera ampliada respecto a la imagen B, en la cual el citrato de sodio fue eliminado de la muestra y el carbono corresponde al ALA, finalmente en la imagen C, el carbono vuelve a presentar una banda más grande debido a la suma de los átomos de carbono entre el ALA y la MAN.

8.2 Radiomarcado

Para el radiomarcado (**Figura 17**), el HYNIC-GGC fue la molécula de anclaje a la AuNP por medio de un tiol dada su facilidad de funcionalización con grupos basados en azufre que son fácilmente adsorbidos en la superficie de oro (22). En este caso se utilizó pertechnetato de sodio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) en vez de pertechnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) como en la reacción original, el cual por medio de una reacción redox con el cloruro de estaño (II) desgasificado con nitrógeno para evitar que compita con el oxígeno y quedar libre; posteriormente por medio de EDDA y Tricina se forma una esfera de coordinación en el extremo de la molécula de HYNIC unida a la AuNP, en la cual el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ funge como el centro de esta y se obtiene la molécula radiomarcada (46).

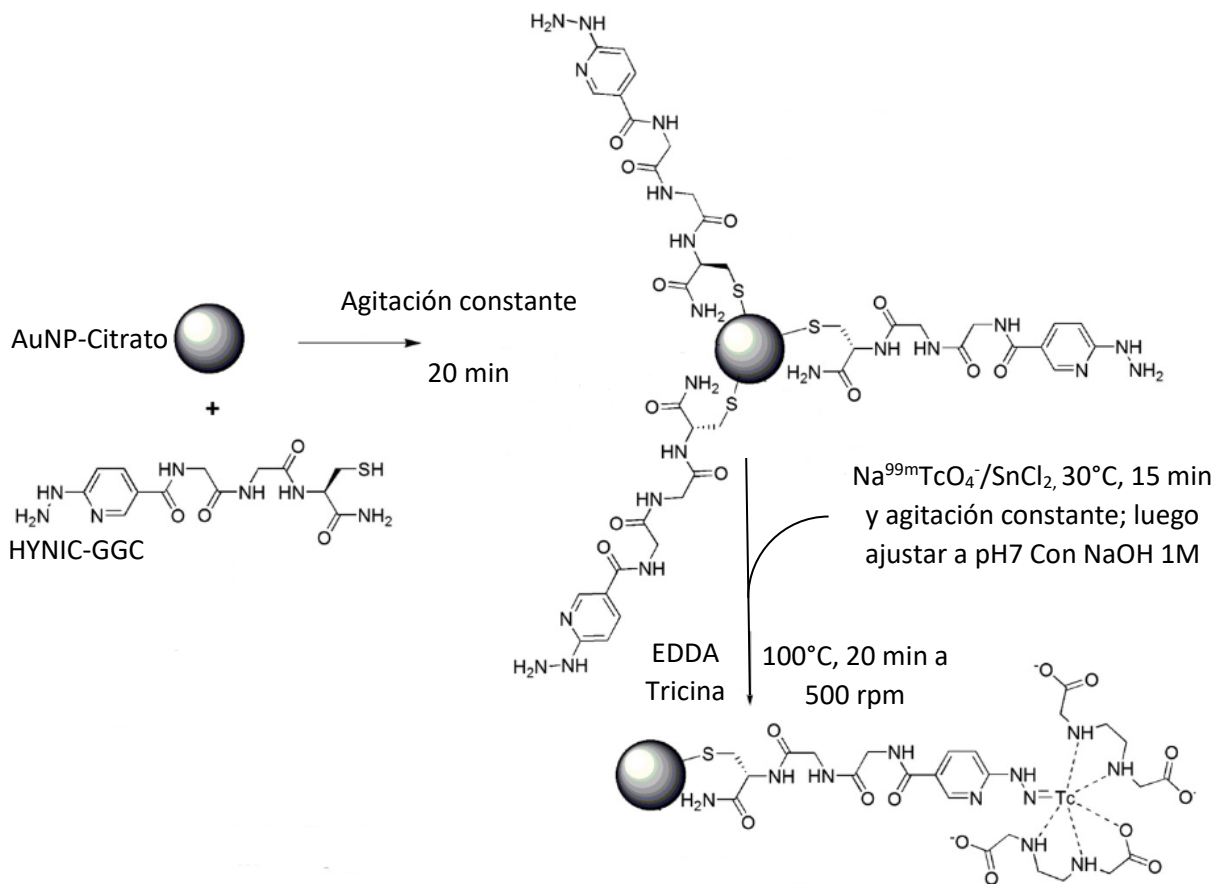


Figura 17. Reacciones durante el radiomarcado. Imagen modificada de (46).

Posterior a la realización del radiomarcado, se tomaron las medidas de la eficiencia (**Figura 18**) para las muestras de ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, las cuales mostraron un comportamiento casi idéntico, obteniendo 82.68% y 82.22% de eficiencia respectivamente, destacando por tan solo 0.47% de eficiencia la muestra de ^{99m}Tc -AuNPs-MAN.

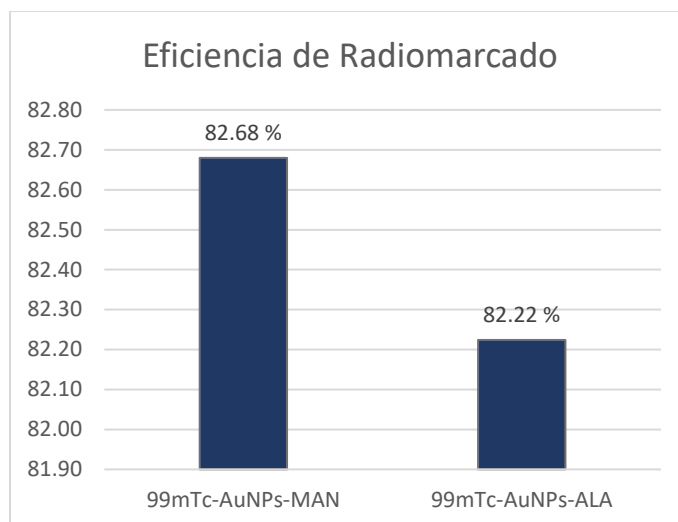


Figura 18. Eficiencia de radiomarcado de los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA.

Para la toma de la pureza de radiomarcado (**Figura 19**), de igual forma se utilizaron las muestras de ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, encontrando una diferencia un poco mayor respecto a la eficiencia, pues ahora se obtuvieron las medidas de 94.86% y 90.48% respectivamente; para esta prueba también destacó el compuesto ^{99m}Tc -AuNPs-MAN por 4.38% respecto a ^{99m}Tc -AuNPs-ALA.

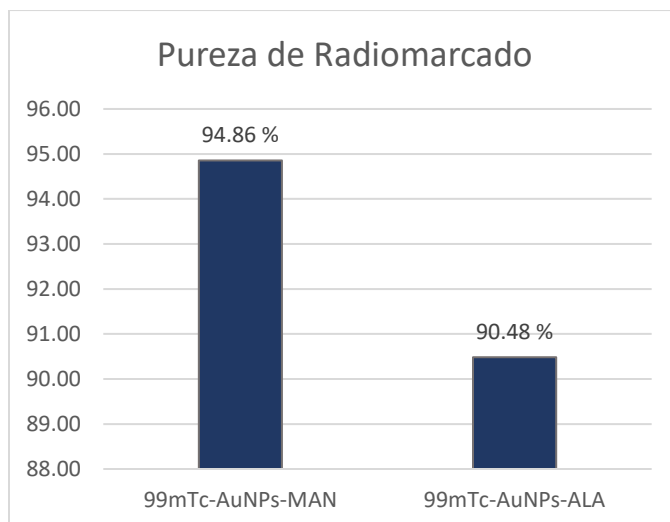


Figura 19. Pureza de radiomarcado de los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA.

La toma de estabilidad del radiomarcado (**Figura 20**) se realizó para los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA tanto en SSI a temperatura ambiente como en

Suero humano a 37 °C, se tomaron medidas por triplicado a las 0, 0.5, 1, 2, 4 y 6 horas, se obtuvo el promedio de la pureza de las medidas junto a su desviación estándar para su posterior graficación. A la hora 0, la muestra ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en SSI mostró una estabilidad del 92.39%, la cual disminuyó con el tiempo. A la hora 6, esta estabilidad se redujo al 76.41%, siendo el menor porcentaje registrado para las 4 muestras a esta hora. Además, este valor presentó un amplio rango de error. Enseguida se ubica la muestra ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en Suero humano, ésta inicia con el menor porcentaje de estabilidad a la hora 0 situado en 83.55% y finalmente culmina a las 6 horas en 79.81%, con algunas fluctuaciones en los tiempos intermedios. Para las muestras ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, tanto en SSI como en suero humano, se comportó de una mejor manera y éstas fueron casi uniformes en estabilidad, al inicio la muestra en SSI presentó 90.26% de estabilidad, mientras que la muestra en suero humano tuvo 92.72%, sobrepasando a la muestra ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en SSI y situándose como la que mejor estabilidad tiene; para la hora 6, la muestra de ^{99m}Tc -AuNPs-ALA en SSI, presentó 94.61%, mientras que la muestra en suero humano alcanzó los 98.92%. Ambas muestras, tanto en SSI como en suero humano de ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, son las únicas que presentaron una mayor estabilidad conforme pasó el tiempo, culminando en la hora 6 con un mayor porcentaje que en la hora 0, además de tener los rangos de error más pequeños para cada punto; la muestra con rangos de error menores fue la de ^{99m}Tc -AuNPs-ALA en suero humano que va de los ± 03.07 a ± 0.69 con el paso de las horas.

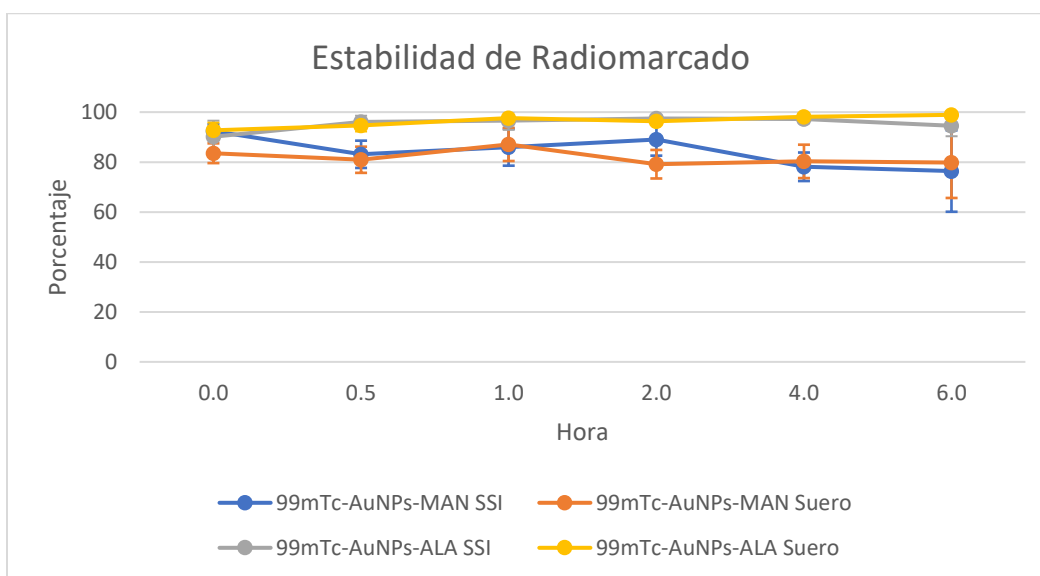


Figura 20. Estabilidad de radiomarcado de los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA en SSI y Suero.

IX DISCUSIÓN

Las AuNPs pueden adsorber grupos basados en azufre con bastante facilidad, permitiendo la unión de moléculas pequeñas o biomoléculas (22), por lo cual, la molécula de ALA, cuya estructura es observable en la **Figura 7**, se intuye que fue adsorbida a las AuNPs por medio de los dos átomos azufre que la molécula contiene, dejando la cadena de carbonos y el grupo carbonilo libres, además de no necesitar ningún catalizador para la reacción. Por otro lado, para obtener el compuesto AuNPs-MAN, se requirió del compuesto AuNPs-ALA, EDC y MAN; la reacción esperada da como resultado un enlace peptídico de tipo amida, en la cual el EDC facilita la formación de este enlace (48). La mayor prueba de la reacción entre ALA y MAN se encuentra en la **Figura 8** y la **Tabla 5**, donde se efectuó un análisis FTIR para la reacción ALA-MAN y se encontraron bandas para una amida secundaria que sólo existe si ésta se lleva a cabo. Cabe reiterar que este análisis no se hizo al compuesto AuNPs-MAN, debido a la baja concentración en que éste se encontraba con relación a la detectable por el equipo, aunque se esperaría el mismo resultado.

Para poder confirmar la correcta funcionalización del compuesto AuNPs-MAN, fueron necesarias diferentes técnicas que en su conjunto confirmarían el éxito obtenido; la espectrofotometría UV-Vis (**Figura 5**) establece que existe un cambio en el compuesto leído, partiendo de las muestras AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN; sin embargo, no se puede confirmar una funcionalización completa, por otro lado, el diámetro hidrodinámico en la **Tabla 2** expresa una media de 29 nm para las AuNPs prístinas, y parte de este diámetro corresponde a los cationes interactuando con la nanopartícula, pues se reiteró el tamaño por medio de un histograma (**Figura 10**) y la media se situó en 20.21 nm de diámetro; el siguiente resultado en la **Tabla 2** establece un aumento en el diámetro de las muestras de ~10 nm entre las AuNPs y AuNPs-ALA, esta medida coincidente con el anillo de la **Figura 11**, donde por medio de SEM, se aprecia un anillo de ~10 nm para las AuNPs-ALA respecto a las prístinas y en la **Figura 14**, correspondiente a AuNPs-ALA analizadas por HRTEM, el anillo tiene una distancia de ~3.19 nm, siendo esta técnica

más exacta y con mayor resolución; con ello, se entiende que el incremento detectado en la medición del diámetro hidrodinámico correspondería a moléculas de ALA unidas a la superficie de la AuNP; finalmente, el diámetro hidrodinámico para la muestra AuNPs-MAN se ve aumentado en ~20 nm, esto debido a los iones interaccionando con el complejo molecular formado; al igual que la anterior, la muestra AuNPs-MAN presenta anillos al momento de analizarla por HRTEM (**Figura 15**), éste tiene una medida de ~6.12 nm, el cual responde a un incremento de tamaño, proporcional al de la unión entre ALA-MAN. Aunado a ello, el potencial Z también se ve alterado, disminuyendo en cada paso de la funcionalización desde AuNPs prístinas hasta llegar a AuNPs-MAN, tendiendo a los -60 mV que tienen los ácidos carboxílicos en la literatura (35).

Todo lo anterior indica que hay moléculas que se adsorben a las AuNPs, sin embargo, para asegurar que sea la molécula que se espera y no otra, se realizaron los estudios de FTIR ubicados en las **Figuras 5-6** y las **Tablas 3-4**, dentro de los cuales, se encontraron bandas concordantes a los grupos funcionales existentes en la estructura molecular de la muestra deseada; en algunos casos se observaron bandas extras, sin embargo, éstas pueden ser producidas por el ruido ambiental, o ser correspondientes al soporte de la muestra, que en este caso fue cuarzo.

Con todo ello, se puede confirmar que las reacciones ocurrieron de la forma esperada hasta el compuesto AuNPs-MAN, por otro lado, se decidió incorporar el estudio STM (**Figura 9**), en ese estudio no se logró apreciar un anillo alrededor de las diferentes muestras de AuNPs, AuNPs-ALA y AuNPs-MAN como pasó en SEM y HRTEM, aunque se apreciaban superficies más rugosas en las AuNPs funcionalizadas contrastadas a las prístinas, esto se interpretó como la presencia de una molécula en su estructura, además, las formas de las AuNPs, tenían una mejor apreciación.

Finalmente, el último estudio de caracterización fue el análisis elemental (**Figura 16**), el cual muestra la presencia de carbono (C), cobre (Cu) y oro (Au) en la muestra, correspondientes a las AuNPs mismas y a moléculas orgánicas presentes que, debido a la información recabada en los otros análisis, se confirma que es el glucósido ALA-MAN.

Para el radiomarcado se decidió comparar los compuestos ^{99m}Tc -AuNPs-MAN y ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, pues si bien el compuesto radiomarcado con MAN era el de interés, se

necesita verificar si en verdad la Manosa funciona y dirige el compuesto entero hacia las células blanco deseadas como los macrófagos M2 con receptor CD206 (28) o no tiene presencia significativa en un modelo biológico, por ello se optó por también radiomarcarse el compuesto con ALA y usarlo como referencia en una futura metodología para quien continúe este proyecto con experimentos *in vivo*, por ejemplo, con la biodistribución del compuesto.

Para las muestras de eficiencia (**Figura 18**) y pureza (**Figura 19**) de radiomarcado, el compuesto ^{99m}Tc -AuNPs-MAN prevaleció sobre el compuesto ^{99m}Tc -AuNPs-ALA, sin embargo, al medir la estabilidad (**Figura 20**), esto fue al revés. La estabilidad de radiomarcado se llevó hasta las 6 horas, pues es lo que se estima tendría que abarcar un análisis *in vivo* en caso de realizarse en un futuro, y aunque se esperaba una estabilidad mayor en el compuesto con MAN, los resultados no fueron bajos, siendo el punto menor ^{99m}Tc -AuNPs-MAN en SSI a las 6 horas con 76.41%. De igual forma cabe resaltar que estos estudios se realizaron en SSI y suero humano pensando en las condiciones fisiológicas y biológicas donde se piensan aplicar en un futuro, donde las muestras en suero humano resultaron mejores que las realizadas en SSI para cada compuesto.

Sabiendo todo esto, se debe retomar la información previa al proyecto. Se realizó un análisis previo con el compuesto ^{99m}Tc -AuNPs-MAN con menos pruebas de caracterización en el sistema linfático de ratones por medio de SPECT-CT (18), pensando en un estado N1-N3 y M1 del cáncer de acorde al sistema TNM, estos rangos comprenden cáncer de etapa III y etapa IV (23,24), pues se pasa por el sistema linfático con existencia del receptor CD206, donde el SLN drena el tumor y funciona como diagnóstico para pacientes (18).

Otra posible aplicación del compuesto es para delimitar parte de un tumor, pues los TAMs, más específicamente los macrófagos M2, poseen altos niveles de receptores CD206, por lo cual, el coloide ^{99m}Tc -AuNPs-MAN debería unirse a ellos y mediante estudios de imagen, mostrar la zona con mayor prevalencia de estas células, lo cual llevaría a la presencia de células cancerígenas; aunque sus usos pueden extenderse, pues las células dendríticas y células endoteliales hepáticas también contienen el mismo

receptor (27,28). El usar los receptores CD206 podría permitir el uso de una menor cantidad del agente, efectos clínicos óptimos, aumento en eficacia y reducción en la toxicidad en los estudios (21).

Con todo esto se puede afirmar que el camino para este compuesto sigue siendo largo, pero promete ayudar a médicos y pacientes que lo requieran en temas de salud, siendo este un futuro prometedor.

X CONCLUSIONES

Se logró funcionalizar nanopartículas de oro con ácido lipóico (AuNPs-ALA) y posteriormente, de manera exitosa se formó una unión covalente entre el ALA y Manosa-NH₂. Esto fue comprobado mediante la caracterización de ambos compuestos (AuNPs-ALA y AuNPs-MAN). De igual manera, la técnica de radiomarcado con ^{99m}Tc para AuNPs-ALA y AuNPs-MAN se realizó con éxito y se verificó mediante evaluaciones de eficiencia, pureza y estabilidad radioquímica.

XI PERSPECTIVAS DE TRABAJO

El siguiente paso dentro de la investigación del coloide radiomarcado ^{99m}Tc-AuNPs-MAN incluye probarlo en células con altos niveles de receptores de manosa in vitro, evaluar su capacidad de señalización en un sistema in vivo sano y con un ambiente tumoral, además de pruebas clínicas como toxicidad, biodistribución, biodisponibilidad, posología, farmacocinética, entre otros.

XII ANEXOS

A continuación, se dejan las tablas en las que se describen mejor las estructuras a las que las bandas de las figuras en la sección 7.1.3 se refieren.

Tabla 3. Valores registrados en el FTIR de AuNPs de 20 nm en citrato de sodio.

| Valor registrado | Rango en literatura | Nombre | Esquema | Referencia |
|------------------|---------------------|--------------------|---------|------------|
| 3400-3200 | 3400-3200 | Estiramiento de OH | —OH | (18) |

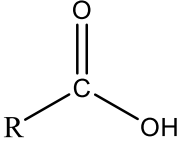
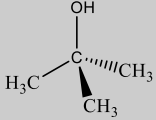
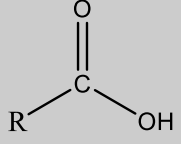
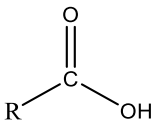
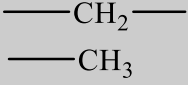
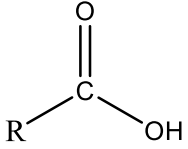
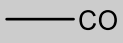
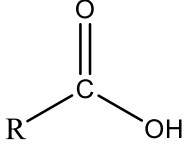
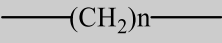
| | | | | |
|--------------------|---|--|--|------|
| 2919 | 2935-2915 | Estiramiento asimétrico de carbono secundario | $\text{---CH}_2\text{---}$ | (47) |
| 2850 | 2865-2845 | Estiramiento de carbono secundario | $\text{---CH}_2\text{---}$ | (47) |
| 1315 y 1420 | 1420-1200 (Dos señales) Primer señal 1320-1200 Señal más débil en 1440-1390 | Torción/Estiramiento del carboxilo |  | (47) |
| 1104 | 1200-1100 | Estiramiento de alcohol terciario |  | (47) |
| 1005 | 1260-970 | Estiramiento del grupo CO | ---CO | (39) |
| 903 | 960-875 | Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo |  | (47) |


Tabla 4. Valores registrados en el FTIR de AuNPs-ALA.

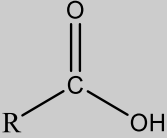
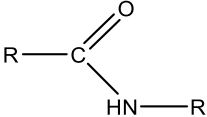
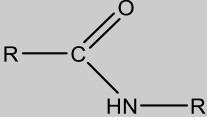
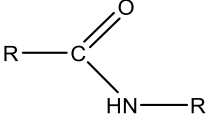
| Valor registrado | Rango en literatura | Nombre | Esquema | Referencia |
|------------------|---------------------|--|----------------------------|------------|
| 3400-3200 | 3400-3200 | Estiramiento de OH | ---OH | (18) |
| 2920 | 2935-2915 | Estiramiento asimétrico de carbono secundario* | $\text{---CH}_2\text{---}$ | (47) |
| 2850 | 2865-2845 | Estiramiento de carbono secundario* | $\text{---CH}_2\text{---}$ | (47) |

| | | | | |
|--------------------|---|---|---|------|
| 1720 | 1725-1700 | Estiramiento del carbonilo en un carboxilo |  | (47) |
| 1452 | 1475-1445 | Comprobación de una cadena de CH ₂ o CH ₃ * |  | (47) |
| 1412 y 1265 | 1420-1200 (Dos señales) Primer señal 1320-1200 Señal más débil en 1440-1390 | Torción/Estiramiento del carboxilo |  | (47) |
| 1007 | 1260-970 | Estiramiento del grupo CO |  | (39) |
| 930 | 960-875 | Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo |  | (47) |
| 714 | 730-710 | 3ra comprobación, cadenas de -(CH ₂)-n con n≥4* |  Con n≥4 | (47) |

*Pertenece a un mismo análisis, es necesario que se presenten las 4 bandas para establecer una comprobación de cadena CH₂ mayor a 4 carbonos.

Tabla 5. Valores registrados en el FTIR de ALA-MAN.

| Valor registrado | Rango en literatura | Nombre | Esquema | Referencia |
|------------------|---------------------|--|--|------------|
| 2930 | 2935-2915 | Estiramiento asimétrico de carbono secundario* |  | (47) |

| | | | | |
|-------------|-----------|---|--|------|
| 2858 | 2865-2845 | Estiramiento de carbono secundario* | $\text{---CH}_2\text{---}$ | (47) |
| 1439 | 1475-1445 | Comprobación de una cadena de CH ₂ o CH ₃ * | $\text{---CH}_2\text{---}$ ---CH_3 | (47) |
| 1044 | 1260-970 | Estiramiento del grupo CO | ---CO | (39) |
| 898 | 960-875 | Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo |  | (47) |
| 3375 | 3500-3100 | Estiramiento de NH en amida secundaria |  | (39) |
| 1635 | 1740-1630 | Estiramiento del grupo carbonilo en la amida secundaria |  | (39) |
| 1568 | 1630-1510 | Estiramiento de NH δ en amida secundaria |  | (39) |

*Pertencen a un mismo análisis, solo se presentan 3 de 4 bandas confirmando una cadena de CH₂ o CH₃ pero no dan información sobre la cantidad de carbonos que la conforman.

XIII REFERENCIAS

1. Bea DB, Tejeda AP, Pardo AA, Cuador C. Nanomedicina: aspectos generales de un futuro prometedor. Revista Habanera de Ciencias Médicas. septiembre de 2011;10(3):12.
2. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. Molecules. 27 de diciembre de 2019;25(1):112.

3. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity - Chemical Society Reviews (RSC Publishing) [Internet]. [citado 28 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cs/c4cs00177j>
4. Taniguchi N, Aarakawa C, Kobayashi T. On the basic concept of nano-technology. En Tokio, Japón; 1974. p. 26-9.
5. Cancela-Vila N. Nanotecnología aplicada a la transportación de antibióticos en ortopedia y traumatología. Acta Ortopédica Mexicana. 2020;34(4):249-53.
6. Quintili M. Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. Cuadernos del Centro de Estudios de Diseño y Comunicación. 2012;(42):125 a 154-125 154.
7. Uribe GM, Rodríguez-López JL. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Perfiles Latinoamericanos. 14(29):161-86.
8. Aguayo F, Zarzuela E, Ramón J. Nanotecnología y nanoquímica. EPS de Sevilla. (36):28-37.
9. Ribeiro S. Nanotecnología: del campo a su estómago. Regional Latinoamericana de la Unión Internacional de Trabajadores de la Alimentación, Agrícolas, Hoteles, Restaurantes, Tabaco y afines [Internet]. 7 de agosto de 2004 [citado 13 de julio de 2022]; Disponible en: <https://www.jornada.com.mx/2004/08/07/016a2pol.php?origen=>
10. Mendoza D. Nanomateriales: nuevas propiedades a menores dimensiones. Ciencia. marzo de 2003;23-9.
11. MERCK. Gold Nanoparticles: Properties and Applications [Internet]. Sigma Aldrich. 2022. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/gold-nanoparticles>
12. Mogharabi M, Abdollahi M, Faramarzi MA. Toxicity of nanomaterials; an undermined issue. Daru. 15 de agosto de 2014; 22:59.

13. García-Calzón JA, Díaz-García ME. Synthesis and analytical potential of silica nanotubes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de mayo de 2012; 35:27-38.
14. Murillo-Vargas F, Jiménez-Villalta G, Esquivel-Alfaro M, Vega-Baudrit JR. Ácido L-poliláctico (PLA) y nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) con potenciales aplicaciones industriales. *Revista Colombiana de Química*. abril de 2021;50(1):20-39.
15. Ramos-Ulate CM, Pérez-Álvarez S, Guerrero-Morales S, Palacios-Monarrez A, Ramos-Ulate CM, Pérez-Álvarez S, et al. Biofertilización y nanotecnología en la alfalfa (*Medicago sativa* L.) como alternativas para un cultivo sustentable. *Cultivos Tropicales* [Internet]. junio de 2021 [citado 7 de octubre de 2021];42(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362021000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
16. Guerra-Morillo MO, Rabasco-Álvarez AM, González-Rodríguez ML, Guerra-Morillo MO, Rabasco-Álvarez AM, González-Rodríguez ML. Fibrosis quística: tratamiento actual y avances con la nanotecnología. *Ars Pharmaceutica* (Internet). junio de 2020;61(2):81-96.
17. Urrejola MC, Soto LV, Zumarán CC, Peñaloza JP, Álvarez B, Fuentevilla I, et al. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *Int J Morphol*. diciembre de 2018;36(4):1463-71.
18. Estudiante-Mariquez OJ, Rodríguez-Galván A, Ramírez-Hernández D, Contreras-Torres FF, Medina LA. Technetium-Radiolabeled Mannose-Functionalized Gold Nanoparticles as Nanoprobes for Sentinel Lymph Node Detection. *Molecules*. 23 de abril de 2020;25(8):1982.
19. Ishii N, Fitrilawati F, Manna A, Akiyama H, Tamada Y, Tamada K. Gold Nanoparticles Used as a Carrier Enhance Production of Anti-Hapten IgG in Rabbit: A Study with Azobenzene-Dye as a Hapten Presented on the Entire Surface of Gold

Nanoparticles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 23 de enero de 2008;72(1):124-31.

20. Enfermedades infecciosas | Williams Obstetricia, 26e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. [citado 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina-mhmedical-com.pbidi.unam.mx:2443/content.aspx?bookid=3103§ionid=267339207#1192305973>
21. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol*. 10 de enero de 2014;1(1):1000003.
22. Daniel MC, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev*. 1 de enero de 2004;104(1):293-346.
23. Estadificación del cáncer [Internet]. American Cancer Society. 2022 [citado 13 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/estadificaciondelcancer.html>
24. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 4 de enero de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
25. Santana-Ríos Z, Fulda-Graue S, Pérez-Becerra R, Urdiales-Ortíz A, Merayo-Chalico C, Hernández-Castellanos V, et al. Estadificación del cáncer de células renales; historia, evolución y perspectivas actuales. *Rev Mex Urol*. 1 de septiembre de 2011;71(5):296-302.
26. Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: The double-faced macrophage mannose receptor. *Critical reviews in immunology*. 2004;24(3):179-92.

27. Liu Y, Cao X. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell Mol Immunol.* enero de 2015;12(1):1-4.
28. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:901-44.
29. Martinez-Pomares L, Linehan SA, Taylor PR, Gordon S. Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology.* diciembre de 2001;204(5):527-35.
30. Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science.* 8 de marzo de 2002;295(5561):1898-901.
31. Maccora D, Dini V, Battocchio C, Fratoddi I, Cartoni A, Rotili D, et al. Gold Nanoparticles and Nanorods in Nuclear Medicine: A Mini Review. *Applied Sciences.* enero de 2019;9(16):3232.
32. Cardoso KMB, Rojano NG. Factores que influyen en la estimación del tamaño de partícula promedio por dispersión de luz dinámica para nanopartículas. *Simposio de Metrología 2016.* 2016;2.
33. Cathy Murphy. How can yoy calculate how many atoms are ina a particle? [Internet]. *Sustainable nano.* 2016 [citado 3 de abril de 2023]. Disponible en: <https://sustainable-nano.com/2016/07/28/how-many-atoms-are-in-a-nanoparticle/>
34. Mayoral JB, Moreno AC, Martín-Martínez ES. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. 2014;8(4):6.
35. Volkert AA, Subramaniam V, Ivanov MR, Goodman AM, Haes AJ. Salt-Mediated Self-Assembly of Thioctic Acid on Gold Nanoparticles. *ACS Nano.* 28 de junio de 2011;5(6):4570-80.
36. Piqué TM, Vázquez A. Uso de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento Investigación y desarrollo.* junio de 2012;3(2):62-71.

37. CV I y SAS de. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) [Internet]. ISASA Latam. [citado 4 de enero de 2023]. Disponible en: <https://isasalatam.com/molecular/espectrometria-infrarroja-con-transformada-de-fourier-ftir/>
38. Ghaedi H, Ayoub M, Sufian S, Lal B, Uemura Y. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors. *Journal of Molecular Liquids*. 1 de septiembre de 2017; 242:395-403.
39. Prestsch E, Bühlmann P, Badertscher M. *Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data*. 4th ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2009. 443 p.
40. Rodríguez-Galván A, Contreras-Torres FF. Scanning Tunneling Microscopy of Biological Structures: An Elusive Goal for Many Years. *Nanomaterials*. enero de 2022;12(17):3013.
41. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. 7 × 7 Reconstruction on Si(111) Resolved in Real Space. *prl*. 10 de enero de 1983; 50:120.
42. Avila A, Bonilla R. Estudio de superficies usando un microscopio de efecto túnel (STM). *Ingeniería e Investigación*, ISSN 0129-5608, Vol 29, N° 3, 2009, pags 121-127. 1 de septiembre de 2009;29.
43. Castroviejo M. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) | Universidad de Burgos [Internet]. Universidad de Burgos. 2020 [citado 27 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientificos-tecnicos/microscopia/microscopia-electronica-de-barrido-meb>
44. Escalante C, Sierra E. Fundamentals of transmission electron microscopy, the technique with the best resolution in the world. 10 de febrero de 2019;1-6.
45. Calderón HA. Microscopía electrónica de transmisión para observar átomos: principios y desarrollo. *Mundo nano Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*. septiembre de 2020;13(25):133-56.

46. Ocampo-García BE, Ramírez F de M, Ferro-Flores G, De León-Rodríguez LM, Santos-Cuevas CL, Morales-Avila E, et al. (99m) Tc-labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl Med Biol.* enero de 2011; 38(1):1-11.
47. Rojo F. Tablas de Espectroscopía Infrarroja [Internet]. [citado 27 de enero de 2023]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_34338.pdf
48. Hermanson G. *Bioconjugate techniques*. 3rd ed. USA: Academic Press; 2013. 1140 p.